

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

# **Veränderte Genexpression in der Muskulatur von Kindern mit Cerebralparese (CP)**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Jens Böhmer

aus  
Offenbach am Main

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Florian Heinen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Prof. Dr. Andreas Holzinger

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Ingo Borggräfe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2014

## Abkürzungen

AIS	Amnioninfektionssyndrom
a-MN	Alpha-Motoneuron
BFMF	Bimanual Fine Motor Function
BoNT	Botulinumtoxin
BS-CP	Bilateral spastische CP
CP	Cerebralparesen
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTI	Diffusion tensor imaging
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMG	Elektromyographie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF	Fibroblast growth factor
GDF8	growth differentiation factor 8
HKS	Herz-Kreislauf-Stillstand
IGF	Insulin-like growth factor
GMFCS	Gross Motor Function Classification System
IL	Interleukin
ITB	Intrathekales Baclofen
MACS	Manual Ability Classification System
MAS	Modifizierte Ashworth-Skala
MMP	Matrix-Metalloproteinase
m-RNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Stickoxid
P-4-H	Prolyl-4-Hydroxylase

PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RNA	Ribonucleic acid
SCPE	Surveillance of Cerebral Palsy in Europe
SDR	Selektive dorsale Rhizotomie
SGA	Small for Gestational Age
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TORCH	Toxoplasma gondii, Other (Hepatitis B, Syphilis, Varicella, Humanes Immundefizienz-Virus und Parvovirus B19), Rubella, Cytomegalievirus, Herpes simplex-Virus
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
UMNS	Upper Motoneuron Syndrome
US-CP	Unilateral spastische CP
VEGF	Vascular endothelial growth factor

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
2.1	CEREBRALPARESEN.....	8
2.1.1	Definition.....	8
2.1.2	Klassifikation.....	8
2.1.3	Ätiologie.....	14
2.1.4	Epidemiologie.....	15
2.1.5	Therapie.....	16
2.2	DER MUSKEL BEI CP .....	19
2.2.1	Spastizität.....	19
2.2.2	Chronische Umbauvorgänge.....	22
2.2.3	Molekularbiologie der Fibrose und Atrophie.....	23
2.3	FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	28
<b>3</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN.....</b>	<b>30</b>
3.1	PATIENTEN .....	30
3.2	METHODEN.....	40
3.2.1	Muskelbiopsie.....	40
3.2.2	Gewinnung der m-RNA.....	40
3.2.3	Messung der RNA-Konzentration.....	41
3.2.4	Primerdesign .....	41
3.2.5	cDNA-Synthese .....	42
3.2.6	konventionelle PCR .....	43
3.2.7	real-time quantitative PCR.....	43
3.2.8	Auswertung.....	44
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
4.1	ÜBERPRÜFUNG DER PRIMER .....	46
4.2	QUANTITATIVE EXPRESSION.....	50
4.2.1	Ergebnisse gegenüber Kontrolle .....	50
4.2.2	Ergebnisse im Gruppenvergleich .....	51
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
5.1	PROBENGEWINNUNG .....	52
5.2	INTERPRETATION.....	54
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Gruppe der Cerebralparesen (CP) sind verursacht durch eine nicht-progressive Schädigung des sich entwickelnden Gehirns und stellen die häufigste motorische Behinderung des Kindesalters mit Komorbiditäten wie Epilepsie und Intelligenzminderung dar. Während der Ort der primären Schädigung das zentrale Nervensystem ist, liegt die der klinischen Untersuchung zugängliche Funktionsstörung bei CP in der Muskulatur und äußert sich in Form von Parese und Spastizität. Das heterogene Krankheitsbild wird geprägt vom Management: medikamentöse und interventionelle Beeinflussung von Spastizität (vor allem mit Botulinumtoxin BoNT) sowie Physiotherapie und Behandlung der Komorbiditäten. Muskelhistologische Untersuchungen konnten kein einheitliches Bild der pathologischen Veränderungen bei CP liefern; zuletzt konnte gezeigt werden, dass eine Fibrose mit gesteigerter Ablagerung von Kollagen stattfindet. Fibrose ist bereits in vielen anderen Organsystemen gut untersucht und besteht aus krankhafter Ablagerung von Kollagen, einhergehend mit veränderter Genexpression der korrespondierenden RNA. Des Weiteren konnten bereits viele Stimulatoren der Kollagensynthese, allen voran TGF- $\beta$  identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand von Muskelbiopsien von Patienten mit CP Aussagen zu einer Veränderung der Genexpression treffen zu können. Kernthesen waren zum einen, dass die Kollagenexpression sich unterscheidet gegenüber Kontrolle, zum anderen, dass auch Regulatoren der Kollagenbiosynthese in ihrer Genexpression verändert sind. Des Weiteren wurde postuliert, dass das Alter der Patienten, der Schweregrad ihrer motorischen Beeinträchtigung sowie eine eventuelle Behandlung mit BoNT Einfluss haben auf die Genexpression. Hierzu wurden Muskelbiopsien aus der ischiokruralen Muskulatur der Patienten entnommen, die RNA isoliert und mittels real-time PCR quantifiziert. Die Daten wurden als relative Genexpression gegen ein ubiquitäres Referenzgen normiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Hochregulierung des Genes für Kollagen 1 durch das gesamte Kollektiv der Proben, auch TGF- $\beta$  als zentraler Regulator der Kollagensynthese war signifikant erhöht exprimiert. Viele weitere lösliche Faktoren sowie deren Rezeptoren und in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden involvierte Faktoren zeigten kein verändertes Expressionsmuster. Im Vergleich der Altersgruppen zeigte sich eine signifikant erhöhte Kollagenexpression der unter 7jährigen gegenüber den über 9jährigen. Zwischen Gruppen mit unterschiedlichem Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung zeigte sich, dass sowohl die leicht (GMFCS I/II) als auch die schwer Beeinträchtigten (GMFCS IV/V) Kollagen signifikant höher exprimierten als die Gruppe der moderat Beeinträchtigten (GMFCS III). Zwischen den Gruppen GMFCS I/II und IV/V bestand kein signifikanter Unterschied. Signifikante Unterschiede in der Expression von Kollagen und TGF- $\beta$  zeigte sich überraschenderweise auch zwischen den Gruppen der mit BoNT behandelten und den nicht-behandelten Patienten: hierbei zeigten die BoNT-Behandelten signifikant erhöhte Expressionsmuster für Kollagen und TGF- $\beta$ . Die Studie konnte somit dem klinisch erfassbaren Merkmal der zunehmende Muskelsteife bei Patienten mit CP ein molekularbiologisches Korrelat in Form erhöhter Expression der an Fibrose beteiligten

Faktoren liefern. Nicht geklärt werden konnte die Frage, wie physiologisch erhöhter Kollagenumsatz von pathologischer Kollagenablagerung (=Fibrose) molekularbiologisch unterschieden werden kann.

## 2 Einleitung

### 2.1 Cerebralparesen

#### 2.1.1 Definition

Die Cerebralparesen (englisch: cerebral palsies, CP) sind verursacht durch eine nicht-progressive Schädigung von für die Kontrolle von Motorik zuständigen Arealen während der Entwicklung des fetalen oder infantilen Gehirns. Sie umfassen eine Gruppe von persistierenden Störungen in der Bewegungs- und Haltungsentwicklung und sind damit verantwortlich für Einschränkungen der Aktivität des Patienten. Zusätzlich zu den motorischen Defiziten finden sich bei Patienten mit CP oftmals Veränderungen in den Bereichen der Sinneswahrnehmung, der Intelligenz und Auffassungsgabe sowie Verhaltensauffälligkeiten und/oder eine symptomatische Epilepsie (Bax *et al.*, 2005). Die Definition basiert auf klinischem Bild und Anamnese, nicht auf den unterschiedlichen Ätiologien. Kriterien sind somit eine Störung des sich entwickelnden Gehirns vor der Geburt oder innerhalb der Neonatalperiode (28 Lebensstage) (Ashwal *et al.*, 2004; SCPE, 2000). Nicht zum Bild der CP gezählt werden progressive Zustände, die zum Verlust erworbener Fähigkeiten führen, spinale Erkrankungen sowie muskuläre Hypotonie als isolierter klinischer Befund. Die motorischen Störungen bei CP sind komplex und beinhalten zunächst primäre Defizite (Störungen des Muskeltonus und der Koordination, Muskelschwäche, Verlust selektiver motorischer Kontrolle, Beeinträchtigungen von Balance und Koordination). Diese primären Störungen führen zu sekundären muskuloskeletalen Veränderungen wie Kontrakturen und knöchernen Fehlstellungen, die oftmals orthopädische Eingriffe zur Folge haben, sowie Verlust an Muskelmasse (Atrophie). Die Auswirkungen auf das Individuum wie auf die Gesellschaft sind erheblich, die CP ist unter den chronischen Erkrankungen eine der kostenintensivsten (Murphy *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2009). Obgleich CP per definitionem nicht-progressiver Natur sind, ändert sich das klinische Erscheinungsbild beträchtlich mit der Zeit. Die zunächst hypotone paretische Muskulatur wird spastisch und versteift, es entwickeln sich Kontrakturen bis zu knöchernen Fehlstellungen. Eine Therapie im kurativen Sinne gibt es nicht, vielmehr müsste man streng genommen vom „Management“ der Krankheit sprechen und dieses in die einzelnen Interventionen untergliedern. Primäres Ziel aller Interventionen ist die Verhinderung der Sekundärfolgen der CP, des Weiteren die Stärkung der paretischen Muskeln, die Verbesserung der Mobilität mit dem Ziel der Erlangung funktioneller Autarkie in wichtigen Bereichen des täglichen Lebens (häusliche Umgebung, Schule, Gemeinde) (Papavasiliou, 2009). Die Interventionen werden stets in Kombination angewandt, lassen sich jedoch formal untergliedern in den konservativen Ansatz mit Physiotherapie, Ergotherapie, Orthesen und medikamentöser Behandlung sowie die invasiven Eingriffe, nämlich die intramuskuläre Botulinumtoxinum-Therapie, orthopädische Operationen, die Baclofen Pumpen-Behandlung sowie die selektive dorsale Rhizotomie.

#### 2.1.2 Klassifikation

Die Klassifikation der CP erfolgt in erster Linie anhand Art und Schweregrad der motorischen Störung (Christine *et al.*, 2007). Die Untergruppen sind spastische, dyskinetische und ataktische CP, wobei die



spastischen CP mit über 90% dominieren. Die spastischen CP sind gekennzeichnet durch geschwindigkeitsabhängige muskuläre Hypertonie, pathologische Reflexe (Hyperreflexie, Pyramidenbahnzeichen wie z. B. positive Babinski-Antwort), die zu abnormen Bewegungs- und Haltungsmustern führen (typisch sind die innenrotierte und abduzierte Hüfte sowie die Spitzfußstellung und der pronierte, flektierte Unterarm). Kennzeichen der dystonen CP sind der wechselnde Muskeltonus, einhergehend mit unwillkürlich sich wiederholenden Bewegungen. Die dystonen CP können noch weiter untergliedert werden, in die dystone Form mit überwiegend hypokinetisch-hypertoner Bewegungsstörung und die choreo-athetoide Form mit hypoton-hyperkinetischer Ausprägung. Die ataktische Form der CP schließlich ist hauptsächlich geprägt durch Ataxie, Dysmetrie und (Intentions-) Tremor bei muskulärer Hypotonie. Die spastischen CP als Hauptgruppe der CP werden weiterhin topographisch unterteilt in bilateral-spastische (BS-CP) sowie unilateral-spastische (US-CP) Formen. Veraltete, jedoch noch häufig anzutreffende Begriffe aus der Topographie sind Hemiparese, Diplegie und Tetraparese /-plegie (SCPE, 2000).

Der Schweregrad der funktionellen Beeinträchtigung wird unter Zuhilfenahme standardisierter Scores ermittelt. Die Grobmotorik wird mittels des GMFCS (*Gross Motor Function Classification System*) beurteilt (Palisano *et al.*, 1997; McDowell *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 1995; Heinen *et al.*, 2009). Die Einstufung mittels GMFCS korreliert auch mit dem Grad der Muskelatrophie bei älteren Menschen mit CP (Ohata *et al.*, 2008). Es werden 5 Schweregrade unterschieden, die altersabhängig ermittelt werden (siehe Tabelle 1). Die Beurteilung der Feinmotorik kann mittels BFMF (*Bimanual Fine Motor Function*) (Beckung & Hagberg, 2002) oder MACS (*Manual Ability Classification System*) (Eliasson *et al.*, 2006) erfolgen. Wichtig bei der klinischen und insbesondere publikatorischen Anwendung dieser Scores ist die Beachtung ihrer Eigenschaft der Ordinalskalierung, die es verbietet, Abstände zwischen einzelnen Gruppen mathematisch zu erfassen oder gar Mittelwerte in einer Kohorte zu berechnen. Ebenfalls nicht vergessen werden darf die Erkennung und Behandlung oben genannter Komorbiditäten, deren Häufigkeit mit dem Schweregrad der CP zunehmen (Beckung & Hagberg, 2002).

Tabelle 1: GMFCS

Vor dem 2. Geburtstag:	
Stufe I	Die Kinder bewegen sich in und aus dem Sitz auf den Boden; freies Sitzen ohne Abstützen auf dem Boden, beide Hände sind dabei frei zum Spielen. Die Kinder krabbeln, ziehen sich zum Stand hoch und laufen einige Schritte mit Festhalten an Möbeln entlang. Die Kinder laufen zwischen dem 18. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr frei ohne eine zusätzliche Gehhilfe.
Stufe II	Die Kinder sitzen frei auf dem Boden, evtl. ist ein Abstützen mit den eigenen Händen notwendig, um das Gleichgewicht zu halten. Die Kinder robben oder krabbeln. Die Kinder können sich in den Stand ziehen und einige Schritte mit Festhalten an Möbeln entlang laufen.

Stufe III	Die Kinder können auf dem Boden sitzen, wenn die Lendenwirbelsäule unterstützt wird. Die Kinder rollen oder robben vorwärts.
Stufe IV	Die Kinder haben Kopfkontrolle, aber beim Sitzen auf dem Boden ist Unterstützung am Rumpf erforderlich. Die Kinder können sich von Bauchlage auf den Rücken drehen, gelegentlich auch umgekehrt von Rückenlage in die Bauchlage.
Stufe V	Die willkürliche Kontrolle von Bewegungen ist stark eingeschränkt. Weder im Sitzen noch in der Bauchlage können Kopf und Rumpf gegen die Schwerkraft aufrecht gehalten werden. Die Kinder benötigen zum Drehen / Rollen Hilfestellung von einem Erwachsenen.
Zwischen dem 2. und 4. Geburtstag:	
Stufe I	Die Kinder sitzen frei auf dem Boden, beide Hände können zum Hantieren mit Gegenständen benutzt werden. Bewegungsübergänge in und aus dem Sitz vom Boden zum Stand sind ohne fremde Hilfe möglich. Die bevorzugte Fortbewegung ist das freie Gehen ohne Gehhilfen.
Stufe II	Die Kinder sitzen frei auf dem Boden, evtl. bestehen Gleichgewichtsprobleme, wenn beide Hände benutzt werden, um mit Gegenständen zu hantieren. Bewegungsübergänge in und aus dem Sitz sind ohne Hilfe eines Erwachsenen möglich. Die Kinder gelangen von stabiler Unterlage in den Stand. Reziprokes Krabbeln auf Händen und Knien ist möglich; die bevorzugte Fortbewegung ist das Entlanggehen an Möbeln oder das Gehen mit Hilfsmitteln.
Stufe III	Die Kinder sitzen auf dem Boden häufig nur im „W-Sitz“ frei (Sitz zwischen flektierten und nach innen rotierten Hüften und Knien). Die Sitzposition kann eventuell nur mit Hilfestellung eines Erwachsenen eingenommen werden. Die bevorzugte Fortbewegung ist das Robben oder Krabbeln (oftmals nicht reziprok). Die Kinder können sich möglicherweise aus stabiler Unterlage zum Stand hochziehen und seitlich eine kurze Strecke gehen. Die Kinder können mit einer Gehhilfe (Rollator) im Haus gehen und benötigen Hilfestellung beim Drehen und Richtungswechsel.
Stufe IV	Die Kinder sitzen auf dem Boden, wenn sie in die Sitzposition gebracht werden, hierbei werden beide Hände zum Abstützen benötigt, um Gleichgewicht und Aufrichtung zu halten. Häufig werden speziell angepasste Hilfsmittel zum Sitzen und Stehen benötigt. Eine selbständige Fortbewegung über kurze Strecken (innerhalb eines Raumes) wird durch Rollen, Robben oder nicht reziprokes Krabbeln erreicht.
Stufe V	Die körperliche Behinderung begrenzt die willkürliche Kontrolle von Bewegungen und die Fähigkeit, Kopf und Rumpf gegen die Schwerkraft aufrecht zu halten. Jegliche motorische Funktion ist beeinträchtigt. Funktionelle Einschränkungen im Sitzen und im Stehen, die auch mit angepassten Hilfsmitteln und unterstützender Technik nicht vollständig kompensiert werden können.

	<p>siert werden können. Kinder in der Stufe V können sich nicht selbständig fortbewegen und werden transportiert. In Einzelfällen wird Eigenmobilität mit einem speziell angepasstem E-Rollstuhl erreicht.</p>
Zwischen dem 4. und 6. Geburtstag:	
Stufe I	<p>Die Kinder können sich auf einen Stuhl selbständig hinsetzen, sitzen bleiben und wieder aufstehen ohne Zuhilfenahme der Hände. Sie können selbständig vom Boden und aus einem Stuhl aufstehen ohne Zuhilfenahme von Gegenständen zur Unterstützung. Die Kinder können innerhalb / außerhalb der Wohnung frei gehen und frei Treppensteigen. Beginnende Fähigkeit zu rennen und zu hüpfen.</p>
Stufe II	<p>Die Kinder können auf einem Stuhl sitzen, die Hände sind dabei frei, um mit Gegenständen zu hantieren. Die Kinder können vom Boden oder aus einem Stuhl selbständig aufstehen, benötigen hierfür aber oft eine stabile Unterlage zum Ziehen und Drücken mit den Armen. Die Kinder können frei gehen (ohne Gehhilfe) innerhalb der Wohnung und für kurze Strecken auf ebenen Grund außerhalb der Wohnung. Treppensteigen ist mit Festhalten am Geländer möglich, Rennen und Springen sind nicht möglich.</p>
Stufe III	<p>Die Kinder sitzen auf einem normalen Stuhl, eventuell ist Unterstützung im Becken- oder Rumpfbereich notwendig zur Optimierung der Handfunktion. Zum Aufstehen / Hinsetzen von einem Stuhl wird oft eine stabile Oberfläche benötigt, um sich mit den Armen zu ziehen oder zu drücken. Die Kinder können mit einer Gehhilfe auf ebenen Untergrund selbständig gehen, Treppensteigen mit Unterstützung eines Erwachsenen. Über längere Entfernungen oder auf unebenem Untergrund werden die Kinder transportiert.</p>
Stufe IV	<p>Die Kinder sitzen auf einem Stuhl, benötigen aber eine angepasste Sitzvorrichtung zur Stabilisierung des Rumpfes und zur Optimierung der Handfunktion. Aufstehen und Hinsetzen von einem Stuhl ist mit Hilfe eines Erwachsenen oder einer stabilen Unterlage, um sich mit dem Armen zu drücken oder zu ziehen, möglich. Die Kinder gehen allenfalls kurze Strecken am Rollator unter Aufsicht, haben Schwierigkeiten beim Richtungswechsel oder beim Halten des Gleichgewichts auf unebenen Untergrund. Außerhalb des Hauses werden die Kinder transportiert, eventuell selbständige Fortbewegung durch E-Rollstuhl.</p>
Stufe V	<p>Die körperliche Behinderung begrenzt die willkürliche Kontrolle von Bewegungen und die Fähigkeit Kopf und Rumpf gegen die Schwerkraft aufrecht zu halten. Jegliche motorische Funktion ist beeinträchtigt. Funktionelle Einschränkungen im Sitzen und im Stehen, die auch mit angepassten Hilfsmitteln und unterstützender Technik nicht vollständig kompensiert werden können. Kinder der Stufe V haben keine selbständige Fortbewegung und werden transportiert. In Einzelfällen wird Eigenmobilität mit einem speziell angepassten E-Rollstuhl erreicht.</p>
Zwischen dem 6. und 12. Geburtstag:	

Stufe I	Die Kinder können zu Hause, in der Schule, außerhalb und in der Umgebung frei gehen. Die Kinder können ohne zusätzliche körperliche Hilfe Bordsteine herauf- und hinabsteigen, sowie Treppensteigen ohne Festhalten am Geländer. Rennen und Hüpfen sind möglich, aber Geschwindigkeit, Gleichgewicht und Koordination sind eingeschränkt. Die Kinder können an körperlichen Aktivitäten und am Sport teilnehmen, abhängig von persönlichen Wünschen und Umweltbedingungen.
Stufe II	Die Kinder gehen frei in den meisten Situationen, haben aber Schwierigkeiten bei langen Distanzen und auf unebenen Untergrund, bei Gefälle, bei Menschenmengen, beengten Wegen oder wenn sie einen Gegenstand tragen. Die Kinder können Treppen mit Festhalten am Geländer herauf und hinabsteigen oder mit körperlicher Hilfe, wenn kein Geländer vorhanden ist. Außerhalb und in der Umgebung können sie mit körperlicher Unterstützung oder mit einer Gehhilfe gehen oder sie benutzen für längere Wege einen Rollstuhl. Rennen und Hüpfen sind bestenfalls eingeschränkt möglich. Die Einschränkungen in der Durchführung von körpermotorischen Aufgaben können Adaptionen nötig machen, die es ermöglichen an körperlichen Aktivitäten und am Sport teilzunehmen
Stufe III	Die Kinder können drinnen meistens mit einer Gehhilfe gehen. Wenn die Kinder hingesetzt werden, können sie einen Sitzgurt für Beckenaufrichtung und Balance benötigen. Bei Übergängen vom Sitzen zum Stand und vom Boden zum Stand wird körperliche Hilfe von einer Person oder einer unterstützende Oberfläche benötigt. Bei längeren Entfernungen benutzen die Kinder eine Form der rollenden Mobilität. Kinder können möglicherweise Treppen mit Festhalten am Geländer unter Aufsicht oder mit körperlicher Unterstützung hinauf- und hinabgehen. Die Einschränkungen des Gehens können Adaptionen notwendig werden lassen, die es erst ermöglichen an körperlichen Aktivitäten und Sport teilzunehmen, einschließlich eines Aktiv- Rollstuhls oder eines E-Rollstuhls.
Stufe IV	Die Kinder benutzen Fortbewegungsmethoden, die in den meisten Fällen körperliche Unterstützung oder elektrische Mobilität beinhalten. Die Kinder benötigen angepasste Sitzvorrichtungen für Rumpf- und Beckenkontrolle; auch für die meisten Transfers wird körperliche Unterstützung benötigt. Zuhause bewegen sich die Kinder am Boden fort (rollen, kriechen oder krabbeln), gehen kurze Strecken mit körperlicher Unterstützung oder benutzen elektrische Mobilität. Wenn die Kinder in den Stand gebracht werden, können sie zu Hause oder in der Schule einen Rollator benutzen. In der Schule, draußen und in der Umgebung werden die Kinder in einem Aktiv- Rollstuhl geschoben oder sie benutzen einen E-Rollstuhl. Durch Einschränkungen in der Fortbewegung werden Anpassungen benötigt, die es erst ermöglichen an körperlichen Aktivitäten oder am Sport teilzunehmen, einschließlich körperlicher Unterstützung und / oder elektrischer Mobilität.
Stufe V	Die Kinder werden in allen Situationen in einem Rollstuhl transportiert. Die Kinder sind in ihrer Möglichkeit Kopf und Rumpf entgegen der Schwerkraft aufrecht zu halten, sowie bei

	<p>Arm- und Beinbewegungen eingeschränkt. Unterstützende Technologien werden benutzt, um Kopfaufrichtung, Sitz, Stand und / oder Mobilität zu verbessern, aber die bestehenden Einschränkungen können nicht durch die zusätzlich angewendeten Hilfsmittel kompensiert werden. Transfers benötigen die körperliche Unterstützung eines Erwachsenen. Zu Hause können die Kinder kurze Entfernungen auf dem Boden zurücklegen oder werden von einem Erwachsenen getragen. Die Kinder können sich u. U. selbständig mit einem E-Rollstuhl mit umfangreicher Adaptation der Sitzposition und der Steuerung fortbewegen. Die Einschränkungen in der Mobilität machen Anpassungen nötig, um an körperlichen Aktivitäten und am Sport teilzunehmen, einschließlich körperlicher Unterstützung und das Benutzen elektrischer Mobilität.</p>
Zwischen dem 12. und 18. Geburtstag:	
Stufe I	<p>Die Jugendlichen gehen zu Hause, in der Schule, draußen und in der Umgebung frei. Die Jugendlichen sind in der Lage, Bordsteine ohne körperliche Hilfe hinauf und hinunter zu steigen, sowie Treppen ohne Benutzung des Geländers zu bewältigen. Rennen und Hüpfen sind möglich, aber Schnelligkeit, Gleichgewicht und Koordination sind eingeschränkt. Die Jugendlichen können an körperlichen Aktivitäten und am Sport teilnehmen, abhängig von persönlichen Wünschen und Umweltbedingungen und Möglichkeiten.</p>
Stufe II	<p>Die Jugendlichen gehen in den meisten Situationen frei. Umgebungsfaktoren (wie unebenes Gelände, Gefälle, lange Wegstrecken, Zeitdruck, Wetter, Akzeptanz von Gleichaltrigen) und persönliche Vorlieben beeinflussen die Entscheidung, welche Art von Mobilität gewählt wird. In der Schule oder bei der Arbeit können die Jugendlichen zur Sicherheit an einer Gehhilfe gehen. Draußen und in der Umgebung können die Jugendlichen für lange Strecken den Rollstuhl benutzen. Die Jugendlichen können Treppen hoch- und heruntergehen mit Festhalten am Geländer oder mit körperlicher Unterstützung, wenn kein Geländer vorhanden ist. Die Einschränkungen in der Durchführung körpermotorischer Aufgaben können Anpassungen nötig machen, die es ermöglichen, an körperlichen Aktivitäten oder Sport teilzunehmen.</p>
Stufe III	<p>Die Jugendlichen können mit einer Gehhilfe laufen. Verglichen mit Jugendlichen anderer Stufen zeigen Jugendliche der Stufe III mehr Variabilität in den verwendeten Fortbewegungsmethoden, abhängig von den körperlichen Möglichkeiten, den Umgebungs- und den persönlichen Faktoren. Wenn sie hingesezt werden, benötigen die Jugendlichen unter Umständen einen Sitzgurt für Beckenaufrichtung und Gleichgewicht. Beim Transfer vom Sitz zum Stand und vom Boden zum Stand wird körperliche Hilfe einer Person oder einer unterstützenden Oberfläche benötigt. In der Schule benutzen die Jugendlichen einen Aktiv-Rollstuhl oder einen E-Rollstuhl. Draußen und in der Umgebung werden die Jugendlichen in einem Rollstuhl geschoben oder sie benutzen einen E-Rollstuhl. Die Jugendlichen können eine Treppe mit Festhalten am Geländer unter Aufsicht oder mit körperlicher Un-</p>

	terstützung hinauf und heruntergehen Einschränkungen des Gehens können Anpassungen notwendig machen, die eine Teilnahme an körperlichen Aktivität oder am Sport ermöglichen, einschließlich eigenständiger Benutzung eines Aktiv-Rollstuhls oder eines E-Rollstuhls.
Stufe IV	Die Jugendlichen benutzen in den meisten Situationen einen Aktiv-Rollstuhl. Sie benötigen Sitzadaptionen für Becken und Rumpfkontrolle. Körperliche Unterstützung von einer oder 2 Personen wird für Transfers benötigt. Die Jugendlichen können Gewicht übernehmen, um bei Transfers zum Stand mitzuhelfen. Innerhalb des Hauses können die Jugendlichen unter Umständen mit körperlicher Hilfe eine kurze Strecke laufen, einen Rollstuhl benutzen oder eine Gehhilfe, die den Rumpf mit unterstützt, wenn sie in den Stand gebracht werden. Jugendliche können selbständig einen E-Rollstuhl benutzen. Wenn ein E-Rollstuhl nicht sinnvoll oder vorhanden ist, werden die Jugendlichen in einem Aktiv-Rollstuhl transportiert. Die Einschränkungen in der Mobilität machen Anpassungen nötig, um an körperlichen Aktivitäten oder Sport teilzunehmen, einschließlich körperlicher Unterstützung und / oder elektrischer Mobilität
Stufe V	Jugendliche werden in einem Rollstuhl in allen Situationen transportiert. Die Jugendlichen sind in ihren Fähigkeiten, Kopf- und Rumpfkontrolle entgegen der Schwerkraft aufrecht zu halten, sowie Arm- und Beinbewegungen zu kontrollieren, eingeschränkt. Hilfsmittel werden benutzt, um Kopf- und Rumpfkontrolle, das Sitzen, Stehen und die Mobilität zu verbessern, aber die Einschränkungen werden nicht vollständig durch das Verwenden von Hilfsmitteln kompensiert. Körperliche Unterstützung von einer oder zwei Personen oder ein mechanischer Lift wird bei Transfers benötigt. Die Jugendlichen können unter Umständen selbständige Mobilität durch einen E-Rollstuhl mit umfangreichen Adaptationen von Sitz und Steuerung erlangen. Einschränkungen in der Mobilität machen Anpassungen nötig, um an körperlichen Aktivitäten und Sport teilzunehmen, einschließlich körperlicher Unterstützung und elektrischer Mobilität.

### 2.1.3 Ätiologie

Cerebralparesen umschreiben eine klinisch heterogene Gruppe von Bewegungsstörungen, die ätiologisch multiple Ursachen haben. Ihnen gemein ist, dass die primäre Störung das zentrale Nervensystem betrifft, während sich die als CP klassifizierten Krankheitsbilder in erster Linie und mit zunehmendem Alter immer deutlicher in der Peripherie, nämlich am vom Nervensystem gesteuerten Muskel und damit am gesamten Bewegungsapparat auswirken und beobachten lassen. Einteilungen können hierbei erfolgen anhand der Art der einwirkenden Noxe sowie des Zeitpunktes. Zeitlich gesehen können auf das sich entwickelnde Gehirn einwirkende Störkräfte entweder antenatal (Prematurität per se, Zwillingschwangerschaft mit oder ohne Transfusionsyndrom, Small for gestational Age (SGA), Plazentainsuffizienz, maternale/intrauterine Infektionen (insbesondere TORCH) sowie genetisch bedingte

Störungen von neuronaler Proliferation, Migration oder Organisation) oder aber peri-/neonatal einwirken (Infektionen, Plazentaruptur, Amnioninfektionssyndrom (AIS), Kernikterus, Trombophilie/ Koagulopathie als Ursache von hämorrhagischem oder ischemischem zerebralen Insult, Asphyxie). Post-neonatal (28 Tage bis 2 Jahre) einwirkende Störgrößen (Meningo-Encephalitis, Schädel-Hirn-Trauma, Schlaganfall, Ertrinkungsunfall) tragen zu weniger als 5% der Fälle von CP bei.

Das Läsionsmuster wird vom Zeitpunkt der Läsion bestimmt; zum einen, da unterschiedliche Hirnbe-reiche zu unterschiedlichen Zeitpunkten vulnerabler sind als andere, zum anderen, weil bestimmte Noxen zu charakteristischen Zeiten einwirken. Während des 1. und 2. Trimesters der Schwangerschaft einwirkende Noxen führen zu Fehlbildungen des Gehirns, früh im 3. Trimester eintreffende Schädigungen gehen mit periventrikulärer Infarzierung und Leukomalazie einher, ab dem späten 3. Trimester ziehen Schädigungen Veränderungen in kortikalen und subkortikalen Bereichen sowie in den Basalganglien nach sich.

#### 2.1.4 Epidemiologie

Mit einer Häufigkeit von 2-3 pro 1000 Lebendgeburten sind die CP die häufigste motorische Störung im Kindesalter (SCPE, 2000; Himmelmann *et al.*, 2005). Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g haben ein 70-fach erhöhtes Risiko für CP verglichen mit denen mit einem Geburtsgewicht über 2500 g (SCPE, 2002). Die Prävalenzraten sinken ebenfalls signifikant mit steigendem Gestationsalter: 14,6% für Kinder geboren 22. – 27. SSW; 6,2% in der 28 – 31. SSW; 0,7% in der 32. – 36. SSW und 0,1% in Reifgeborenen. Eine Verbindung zwischen Schwere der CP und Gestationsalter konnte nicht gefunden werden (Himpens *et al.*, 2008). Eine neue Studie der europäischen Gruppe für Surveillance der CP (SCPE) an Patienten mit einem Gewicht von über 2500g zeigte eine Prävalenz von 1,16/1000 Lebendgeburten, was einem stabilen Trend entspricht. Die Untergruppen zeigten 45.7% für die BS-CP, 39.2% für die US-CP, 9.3% für die dyskinetischen und 5.8% für die ataktischen CP. Dies entspricht einem klaren Anstieg der US-CP bei gleichzeitiger Abnahme der BS-CP. Die Autoren weisen darauf hin, dass sich Prävalenz-Studien weniger gut eignen für ätiologische Fragestellungen als Inzidenz-Studien; des Weiteren spekulieren sie, dass die Abnahme bei den BS-CP auf bessere Neonatal-Versorgung zurückzuführen sei, haben jedoch zur Zeit kein schlüssiges Konzept, das die gleichzeitige Zunahme der US-CP erklären würde (Sellier *et al.*, 2010). Die Vermutung der besseren neonatalen Versorgung als Ursache für Veränderungen in der Prävalenz von CP wird auch unterstützt durch Studien, die sinkende Prävalenzen in der Kohorte der extrem Frühgeborenen zeigen (Platt *et al.*, 2007). Die nach wie vor sehr hohe Rate an Komorbiditäten kann an dieser Stelle nur unterstrichen werden (Venkateswaran & Shevell, 2008). Insgesamt zeigt sich, dass die Lebenserwartung von Menschen mit CP in den letzten 20 Jahren gestiegen ist, was unter anderem auf die breitere Versorgung der Patienten mit PEG-Sonden (perkutane endoskopische Gastrostomie) zur adäquaten Nahrungsversorgung zurückzuführen ist (Strauss *et al.*, 2008; Strauss *et al.*, 2007).

## 2.1.5 Therapie

### 2.1.5.1 Konservativ

#### 2.1.5.1.1 Physiotherapie

Die Physiotherapie stellt nach wie vor den Grundpfeiler in der Behandlung der Patienten mit CP dar. Oftmals ist der Physiotherapeut der zentrale Ansprechpartner der Familie eines Kindes mit CP, der Therapiepläne erstellt und die oftmals schwierigen Übergangsphasen (z.B. Grundschule/weiterführende Schule) begleitet und plant. Die Physiotherapie zielt vornehmlich auf die Verbesserung der grobmotorischen Fähigkeiten (Aufstehen, Sitzen, Gehen mit oder ohne Stützen, Gebrauch des Rollstuhls) zur Erhöhung der funktionalen Mobilität ab. Trotz nach wie vor ungenügender Datenlage über den Effekt gibt es breiten Konsensus hinsichtlich ihrer Eignung und Wichtigkeit für Menschen mit CP (Chiarello *et al.*, 2005) (Bax, 2001).

#### 2.1.5.1.2 Ergotherapie

Die Ergotherapie konzentriert sich auf die feinmotorischen, visuo-spatiiellen und sensorischen Schwierigkeiten von Menschen mit CP und versucht damit in erster Linie, Fähigkeiten für den Alltag zu erwerben (zum Beispiel Anziehen, Toilettengang) sowie Strategien zu entwickeln, Schwächen zu kompensieren (zum Beispiel im Bereich des Schreibens). Ergotherapie lässt sich noch weniger standardisieren als Physiotherapie, was sich in der unzureichenden Studienlage niederschlägt. Jedoch zeigt sie sich anderen Therapieformen durchaus gleichwertig und hat ihren festen Platz in der Behandlung der CP (Kunz *et al.*, 2006).

#### 2.1.5.1.3 Weitere Therapieformen

Erwähnung finden hier Therapieformen wie die *neurodevelopmental therapy (NDT)* nach Bobath, die versucht, abnormale Bewegungs- und Haltungsmuster in normale zu überführen mit dem Ziel maximaler Unabhängigkeit und die durchaus messbare Erfolge verzeichnet (Butler & Darrah, 2001), des weiteren die von Pető erdachte konduktive Förderung (*conductive education*), eine Kombination aus edukativen und therapeutischen Maßnahmen, die stark Aufgaben-orientiert arbeitet (Parkes *et al.*, 2002). Vielfach angewandt werden passive Dehnungsübungen (Gracies, 2001) sowie Fitness- und Krafttraining (Blundell *et al.*, 2003; Verschuren *et al.*, 2007). Die Datenlage ist ungenügend.

#### 2.1.5.1.4 Orthesen

Orthesen sind extern applizierte, dem Körper angepasste Hilfsmittel, die abnormale Haltungen zu korrigieren versuchen, sowohl zwischen einzelnen Körperteilen als auch gegen die Schwerkraft. Sie werden angewendet, um sekundäre Deformitäten zu korrigieren oder zu verhindern, und helfen, den Körper in bestimmte Haltungen zu versetzen und diese zu bewahren. In erster Linie werden statische Orthesen angewendet, erste Studien mit dynamischen Orthesen (Roboter-assistierte Laufbandtraining mittels Lokomat<sup>®</sup>) wurden durchgeführt (Meyer-Heim *et al.*, 2009). Die Anwendung von Orthesen



in der Behandlung der CP wird als essentiell angesehen. Die Studienlage ist begrenzt (Autti-Ramo *et al.*, 2006).

#### 2.1.5.1.5 Orale Pharmakotherapie

Die Behandlung der Spastizität hat mehrere Ziele und Gründe: zum einen kann ihre bessere Kontrolle einen Kraft- und Funktionsgewinn bewirken und sekundäre Folgeschäden verringern, zum anderen kann sie zum Teil heftige Schmerzen verursachen und die adäquate Körperhygiene erschweren (Papavasiliou, 2009). Zur besseren Kontrolle der Spastizität werden Medikamente angewendet, deren Wirkweise nur teilweise verstanden ist. Vermutete Effekte sind Veränderungen der Neurotransmitterwirkungen im zentralen Nervensystem durch Suppression der Wirkung von exzitativem Glutamat oder Steigerung der inhibtiven Wirkungen von gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Angewendet werden Baclofen (Milla & Jackson, 1977), Benzodiazepine (Mathew *et al.*, 2005), Tiazidin (Brin *et al.*, 1999) und Dantrolen (Haslam *et al.*, 1974), das sich von den anderen Medikamenten durch seine periphere Wirkung (Hemmung der Kalziumfreisetzung in der Muskelzelle) unterscheidet. Die Evidenz des Effekts ist schwach, die kognitiven und sedativen Nebenwirkungen können den Funktionsgewinn überwiegen (O'Flaherty & Waugh, 2003). Die antispastische Wirkung der Medikamente kann auch im Zusammenhang ihrer Anwendung in Bereichen anderer Störungen (Epilepsie, Schlafstörungen) nutzvoll sein (Tilton, 2009).

#### 2.1.5.2 Operativ/Interventionell

##### 2.1.5.2.1 Botulinumtoxin

Botulinumtoxin (BoNT) ist ein Neurotoxin, produziert von *Clostridium difficile*. Es existieren 7 verschiedenen Serotypen des Toxins (A-G), die als Zink-Proteasen die Fusion Acetylcholin gefüllter Vesikel mit der präsynaptischen Membran an der neuromuskulären Endplatte verhindern und somit über die Hemmung der Ausschüttung von Acetylcholin eine selektive chemische Denervation (Neurolyse, neuromuskuläre Blockade) initiieren (Tilton, 2009). Das primäre Interventionsziel intramuskulär injizierten Botulinumtoxins ist die Verringerung der Spastizität, deren klinischer Effekt ca. 8-12 Wochen anhält. Die Therapie ist mittlerweile zur Behandlung bei Kindern mit BS-CP jeden Schweregrades etabliert (Ade-Hall & Moore, 2000). BoNT bei Kindern ist stets Teil eines Behandlungsplans, angepasst an Ätiologie, Schwere, Typ und eventuelle Komorbiditäten des Patienten und angewandt in Kombination mit konservativen wie operativen Behandlungsoptionen, was die Chancen erhöht, im Vorfeld gesetzte funktionelle oder präventive Ziele auch zu erreichen bei sicherer Anwendung ohne signifikante Nebenwirkungen (Molenaers *et al.*, 2009; Hagglund *et al.*, 2005b; Hagglund *et al.*, 2005a; Love *et al.*, 2001; Molenaers *et al.*, 2006; Naumann & Jankovic, 2004). Injiziert werden sollte in Analgesie unter Ultraschallkontrolle, die Behandlung reicht von einzelnen Muskeln bis zur multi-level Behandlung (Berweck *et al.*, 2004; Heinen *et al.*, 2006b; Schroeder *et al.*, 2006; Westhoff *et al.*, 2003). Um den Behandlungserfolg zu sichern und allgemein gültige klinische Standards zu schaffen, wurden europäi-

sche wie nationale Expertengruppen gebildet (Heinen *et al.*, 2007; Heinen *et al.*, 2006a; Heinen *et al.*, 2009).

#### 2.1.5.2.2 Selektive dorsale Rhizotomie

Als selektive dorsale Rhizotomie (SDR) wird die operative, selektiv afferente Denervierung von ca. 25-50% der sensorischen Nervenwurzeln der unteren Extremität bezeichnet. Während der Operation wird mittels EMG versucht, die überaktiven Nervenstränge zu identifizieren. SDR wird vor allem für Patienten mit BS-CP und relativ gut erhaltener Funktion der unteren Extremität angewendet und konnte in Studien sowohl eine Reduktion der Spastizität als auch eine Langzeit-Verbesserung der motorischen Funktion zeigen (Smyth & Peacock, 2000; Engsberg *et al.*, 2006; Chicoine *et al.*, 1997; Nordmark *et al.*, 2008). Mittlerweile wird jedoch häufiger auf die SDR zugunsten der intrathekalen Baclofen Pumpen-Therapie verzichtet (Tilton, 2009).

#### 2.1.5.2.3 Intrathekales Baclofen

Indikation für die Behandlung mit intrathekalem Baclofen (ITB) ist typischerweise die schwere BS-CP (GMFCS IV/V, selten III) der unteren Extremität. ITB wird mittels eines Katheters von einer implantierten Pumpe in den intrathekalen Raum appliziert. Aufgrund dieser direkten Applikation werden weniger als 1% der oral benötigten Dosierung an Baclofen benötigt, bei günstigerem Nebenwirkungsprofil (doch potenziell ernsthafte Nebenwirkungen, was die Betreuung in einem spezialisierten Zentrum rechtfertigt). ITB hat sich in Studien als geeignet erwiesen, Spastizität zu reduzieren und zu funktionellen Verbesserungen zu führen (Albright *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 2002; Gilmartin *et al.*, 2000; Hoving *et al.*, 2009; Hoving *et al.*, 2007).

#### 2.1.5.2.4 Orthopädie

Patienten mit CP haben eine nicht-progressive Schädigung von Hirnarealen erlitten, die für die motorische Kontrolle wichtig sind. Die Auswirkungen werden im Zuge von Wachstum und pathologischer Stimulation und Haltung als Ausdruck von Spastizität und Parese mit dem Alter zunehmen. Als Folge dieser adaptiven Umwandlungsprozesse des muskulo-skeletalen Systems durchlaufen die Mehrzahl der Patienten mit CP verschiedene Stadien der Deformität der betroffenen Körperteile: Zunächst die korrigierbare, dynamische Deformität, die keine operativen Eingriffe erforderlich macht, schließlich jedoch oftmals fixierte Deformitäten von Muskulatur und Sehnenapparat mit oder ohne knöchernen Veränderungen. Ziel des integrierten Ansatzes für Patienten mit CP ist es, die oftmals notwendigen Operationen auf das Zeitalter nach dem 6. Lebensjahr hinauszuzögern, zum einen zur Vermeidung früher Rezidiv-Operationen, zum anderen hat sich gezeigt, dass die Langzeit-Ergebnisse positiver ausfallen, wenn die erste Operation nach der motorischen Reifung des Gangbildes erfolgt (Tilton, 2009). Indikation können Schmerzen sowie Funktionseinschränkung und Subluxation/Dislokation eines Gelenks sein. Typischerweise umfassen die orthopädischen Operationen Sehnenverlängerungen, Muskelverlagerungen und Osteotomien. Die Eingriffe werden nach Möglichkeit als Multilevel-Prozeduren in einem Schritt durchgeführt, um Operationsrisiken zu minimieren bei gleichzeitiger Verhinderung von mehreren Immobilisationsperioden (Novacheck & Gage, 2007; Lynn *et al.*, 2009).

## 2.2 Der Muskel bei CP

### 2.2.1 Spastizität

Spastizität ist definiert als eine Bewegungsstörung, charakterisiert durch Geschwindigkeits-abhängige Erhöhung des Muskeltonus (tonischer Dehnungsreflex) mit gesteigerten Muskeleigenreflexen als Ausdruck der Hyperexzitabilität des Dehnungsreflexes als eine Komponente des oberen Motoneuron-Syndromes (upper motor neuron syndrome UMNS) (Lance 1980). Das charakteristische klinische Merkmal von Spastizität ist die Empfindung des Untersuchers, dass passive Dehnung eines Muskel oder einer Muskelgruppe exzessiven Widerstand generiert, der sich durch schnellere Ausführung der Bewegung noch steigert. Eingeteilt werden kann diese Tonuserhöhung klinisch mittels der modifizierten Ashworth-Skala (MAS), siehe Tabelle 2 (Bohannon & Smith, 1987):

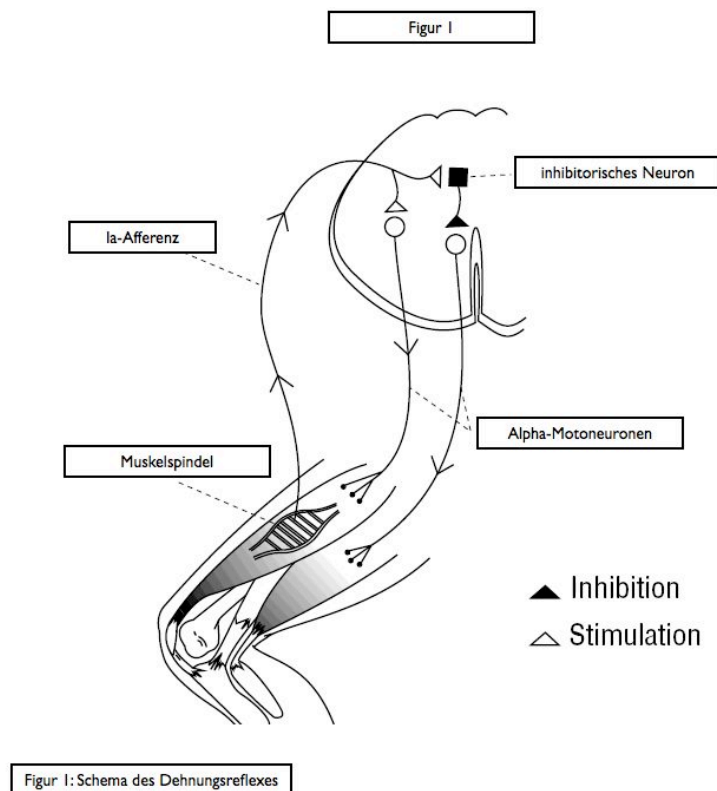
Tabelle 2: Modifizierte Ashworth-Skala

0	Kein erhöhter Tonus
1	Leichte Tonuserhöhung, die an einem „catch and release“ erkennbar wird oder an einem minimalen Widerstand am Ende des Bewegungsausmaßes, wenn das betroffene Gliedmaß in Flexion oder Extension bewegt wird.
2	Leichte Tonuserhöhung, die an einem „catch“ erkennbar wird, der gefolgt wird von einem minimalen Widerstand durch den restlichen (weniger als die Hälfte des) Bewegungsweg.
3	Stärker ausgeprägte Tonuserhöhung durch die meisten Anteile des Bewegungsweges, die betroffenen Gliedmaßen sind aber leicht beweglich.
4	Erhebliche Erhöhung des Muskeltonus, passive Bewegung ist schwierig.
5	Rigide Kontraktur

Auch diese Skala ist wie die GMFCS ordinalskaliert, die Unterschiede zwischen den einzelnen Stufen sind also nicht gleich groß.

Der Ursprung des gesteigerten tonischen Dehnungsreflexes wird in Änderungen segmentaler spinaler Schaltkreise gesehen, die propriozeptive, exterozeptive und deszendierende suprasegmentale Informationen verändert prozessieren (Sherrington 1925). Die charakteristischen Merkmale des UMNS bestehen aus den positiven Symptomen von gesteigertem Dehnungsreflex (Spastizität) und enthemmten Flexorenreflexen der unteren Extremität sowie den negativen Symptomen mit Verlust selektiver motorischer Fähigkeiten (Geschicklichkeit) und Schwächung (Parese) (Lance 1984). Während die positiven Symptome der klinischen Untersuchung und Therapiekonzepten sowie deren Verlaufskontrolle zugänglich sind, sind es oftmals gerade die schwieriger zu erfassenden negativen Symptome, die sich als relevanter für die Funktionabilität des Patienten erweisen. Pathophysiologisch kann der gesteigerte tonische Dehnungsreflex erklärt werden durch Hyperexzitabi-

lität der spinalen alpha-Motoneuronen (alpha-MN), erhöhten Input der durch Muskeldehnung generierten exzitatorischen Afferenzen, oder eine Kombination beider Faktoren. Die Phänomene des gesteigerten Dehnungsreflexes (erhöhter basaler Muskeltonus, gesteigerte Muskeigenreflexe mit leichter Reflexauslösbarkeit sowie verbreiterten Reflexzonen sowie unerschöpflicher Klonus) lassen sich im Kontext der Muskelspindelphysiologie verstehen:



Primäre Ia-Afferenzen umgeben intrafusale Fasern der Muskelspindeln, die durch Dehnung erregt werden. Die Ia-Afferenzen haben monosynaptische exzitatorische Verbindungen mit dem alpha-MN ihres Ursprungsmuskels und alpha-MN von synergistischen Muskeln. Außerdem sind die Ia-Fasern monosynaptisch mit Interneuronen verschaltet, die ihrerseits direkt auf alpha-MN von antagonistischen Muskeln projizieren. Wird der Muskel also passiv gedehnt, erfolgt die Aktivierung von homonymen sowie synergistischen alpha-MN bei gleichzeitiger Hemmung der antagonistischen alpha-MN, was als reziproke Inhibition bezeichnet hat und bei Patienten mit UMNS beeinträchtigt ist. Dafür verantwortlich gemacht werden neuronale Reorganisationen, die sowohl beim Menschen als auch im Tier (*Felis catus*) nachgewiesen wurden (Grillner, 2006; Schomburg, 1990). Neue neuronale Verschaltungen wie das „Aussplassen“ neuer Dendriten (*sprouting*), funktionale Verstärkung bestehender sowie der Wegfall der Hemmung von bisher unbenutzten Verbindungen können die Veränderungen in der Reflexantwort erklären, ebenso wie Hypersensitivierung durch Denervation (Gracies, 2005a) (Gracies, 2005b). Ebenso gibt es Evidenz für Veränderungen in der Reduktion der präsynaptischen Inhibition der Ia-Fasern. Mit dem gesteigerten Dehnungsreflex assoziiert sind das Fehlen oder die Reduktion von funktional essentiellen polysynaptischen (*long-latency*) Reflexen: EMG-Untersuchungen an Patienten mit

unilateraler spastischer Parese, deren Füße auf einem Laufband plötzlich beschleunigt wurden, zeigen eine starke kompensatorische Aktivierung des M. gastrocnemius mit einer Latenz von ca. 80 ms im nicht-betroffenen Bein, während die Beschleunigung des spastisch-paretischen Beines zu einer in Amplitude und Zeit deutlich geringeren Aktivierung führten, die dafür jedoch bereits nach ca. 45 ms auftrat (Berger *et al.*, 1984). Zusätzlich zu all diesen, der passiven klinischen Untersuchung zugänglichen Merkmalen der Veränderung in der Reflexantwort wurden auch Experimente hinsichtlich der Veränderung während aktiver Bewegungen von Patienten mit zentral ausgelöster Spastizität gemacht. So zeigten EMG-Untersuchungen an Patienten mit unilateraler spastischer Parese, die die Aktivität der Wadenmuskulatur während des Gehens untersuchten, dass diese Aktivität deutlich gemindert ist in Bezug auf die Amplitude, sowohl das Maximum als auch das Integral über die Zeit gemessen. Des Weiteren war die Aktivität weniger moduliert, korrespondierend zum Grad der Parese (Berger *et al.*, 1984; Dietz *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass sowohl Inhibition als auch Bahnung spinaler Reflexe der supraspinalen Kontrolle unterliegt, die bei Menschen mit CP gestört ist.

Besonderheiten zeigen sich nun in den Bewegungsmustern bei Kindern mit CP, die stark der Schreitreaktion Neugeborener ähneln (Dietz & Berger, 1995). Diese Schreitreaktionen können auch in anenzephalen Kindern beobachtet werden (Dietz, 1999), was wiederum mit Hinblick auf die Tatsache, dass diese Reaktion bei gesunden Kindern im Zuge der supraspinalen Reifung im Laufe weniger Wochen verschwinden, den Schluss nahe legt, dass die den Schreitreaktionen zugrunde liegenden Bewegungsmuster spinal generiert werden. Die hierfür verantwortlichen Neuronenkreise werden unter dem Begriff des CPG (central pattern generator) subsumiert (Dietz, 2003). Bei gesunden Kindern etabliert sich im Alter von ca. 4 Jahren ein reziproker Modus der Beinmuskel-Aktivierung bei der Lokomotion, einhergehend mit einer Reduktion der monophasischen Reflexpotentiale und gleichzeitiger Stärkung der polysynaptischen Reflexe, die phasischer und kraftvoller werden. In Kindern mit CP zeigt sich dagegen eine Ko-Aktivierung von allen antagonistischen Beinmuskeln während der Standphase einer Gehbewegung, assoziiert mit einer reduzierten und tonischen Aktivierung der Extensoren während der Standphase, vermutlich monosynaptischer Natur, da sie mit kurzer Latenz nach der Dehnung der Wadenmuskulatur auftreten (Dietz & Berger, 1995). Kinder mit CP zeigen also ein unreifes Gangmuster, das nicht auftritt, wenn eine Hirnschädigung nach dem 4. Lebensjahr geschieht. Dies bedeutet, dass sowohl die Schwäche der Agonisten (Parese) als auch die außerordentliche Aktivierung (Ko-Aktivierung) von Antagonisten gemeinsam dazu beitragen, die über ein Gelenk wirkende Netto-Kraft zu verringern und damit aktive Bewegungen zu verringern. Hierbei nicht vernachlässigt werden sollte doch der Aspekt, dass es sich bei der Spastizität um eine evolutionär unreifere, ältere und periphere Art der Kontrolle einer Extremität handelt, die ihren Ursprung ja im Ausfall der im Menschen so eminent ausgeprägten zentralen Kontrolle hat. Im Gegensatz zur schlaffen peripheren Parese trägt die Spastizität also sogar dazu bei, ein Gelenk zu stabilisieren und kann somit in gewissen Umfang als für das Individuum hilfreich angesehen werden.

### 2.2.2 Chronische Umbauvorgänge

In der Betreuung der Bewegungsstörung von Patienten mit UMNS sieht man sich mit einem Amalgam an Problemen konfrontiert, das sich aus den komplexen Interaktionen von positiven und negativen Symptomen der Spastizität (siehe 2.2.1) sowie aus Änderungen des Muskels und weiterer Gewebe zusammensetzt, die chronischer Fehlbelastung ausgesetzt sind: Spastizität, beeinträchtigte Mechanismen der Bewegungsgenerierung, erhöhte Muskelrigidität und Kontrakturen tragen alle zu einer Imbalanz der Kräfte bei, die ein Gelenk stabilisieren und bewegen (Mayer, 1997). Aufgrund der zentralen Ätiologie wurde bisher überwiegend am zentralen Nervensystem geforscht, um Spastizität zu verstehen; die Änderungen der Skelettmuskulatur wurden klassisch am Modell der chronischen Überstimulation erklärt, das sich doch mittlerweile als nicht auf den spastischen Muskel anwendbar gezeigt hat (Foran *et al.*, 2005; Lieber *et al.*, 2004). Die Literatur unterstreicht dahingegen stark die These, dass die Umbauvorgänge in spastischer Muskulatur keinem der gängigen Modelle entsprechen: chronische elektrische Simulation kann quergestreifte Muskulatur in einen langsameren Phänotyp verwandeln (inklusive erhöhter Kapillardichte, geringer Fasergröße, erhöhte Dichte an Typ I-Fasern (so genannte „slow-twitch“-Fasern), erhöhte Ausdauer und verringerter Stärke) (Eisenberg & Salmons, 1981; Pette *et al.*, 1973; Salmons & Sreter, 1976; Salmons & Vrbova, 1969). Das entgegengesetzte Modell der chronisch verringerten Anwendung wurde an Modellen der Gewichtslosigkeit, der Tenotomie und der Immobilisation in gekürzter Position untersucht (Booth & Kelso, 1973; Buller & Lewis, 1965; Roy *et al.*, 1987) und zeigte eine Größenzunahme der Muskelfasern sowie eine Verschiebung hin zum schnelleren Phänotyp der Typ II-Fasern („fast-twitch“). Studien an spastischen Muskeln wurden zumeist mittels Biopsien durchgeführt und zeigen ein sehr heterogenes Bild: Im Gegensatz zum normalen Skelettmuskel mit dicht gepackten, symmetrisch angeordneten Fasern zeigen sich Abnormalitäten wie erhöhter Variabilität der Fasergröße, vermehrte Anzahl an abgerundeten Fasern, „Mottenfraßfasern“ und vermehrte Extrazellulärmatrix (Booth *et al.*, 2001; Castle *et al.*, 1979; Dietz *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 1996; Romanini *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1994). Einige Studien zeigen eine erhöhte Anzahl an Typ I-Fasern (Dietz *et al.*, 1986; Ito *et al.*, 1996; Marbini *et al.*, 2002), einige jedoch eine Zunahme an Typ II-Fasern (Sjostrom *et al.*, 1980), andere fanden keine Änderungen im Distributionsmuster (Booth *et al.*, 2001; Castle *et al.*, 1979; Romanini *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1994). Von methodologischen Problemen der Probengewinnung und –verarbeitung einmal abgesehen, verdeutlichen diese Resultate, dass der spastische Muskel nicht einfach nur chronischer Über- oder Minderbelastung ausgesetzt ist.

Der erhöhte Widerstand gegen passive Dehnung, der spastische Muskulatur definiert, wurde in 2.2.1 als Folge der Reorganisation, die ein Körper nach zerebraler Schädigung durchläuft, erklärt. Um aufzuklären, zu welchen Anteilen dieser erhöhte Widerstand auf passive Eigenschaften des Muskels oder aber auf neuronal vermittelte Erhöhung der Reflexantwort (also: Spastizität) zurückzuführen ist, wurden Experimente an Patienten mit unilateraler Parese im Vergleich zu gesunden Probanden durchgeführt. Hier zeigte sich, dass der passive mechanische Widerstand bei weitem den größten Anteil des über ein Gelenk gemessenen Widerstands ausmachte, die erhöhte Reflexantwort trug nur wenig bei (Sinkjaer & Magnussen, 1994). Es lässt sich schlussfolgern, dass das Verständnis der rheologischen

Eigenschaften des peripheren Bewegungsapparates und dabei in erster Linie deren Veränderung mit der Zeit den Schlüssel für das Verständnis der motorischen Beeinträchtigung von Menschen mit CP darstellt. Diese Beobachtungen sind von eminenter Wichtigkeit, belegen sie doch das dem klinischen Beobachter wohl bekannte Phänomen, dass der von einer spastischen Extremität generierte Widerstand gegen passive Bewegung im Laufe der Zeit mehr und mehr von seiner schnellen, neuronal verursachten Komponente verliert und vielmehr statisch reagiert, was auf dauerhafte Veränderungen in der Muskulatur sowie der umgebenden extrazellulären Matrix schließen lässt. Nur wenige gingen bisher der histopathologischen Untersuchung der veränderten Muskulatur nach; die Studien mündeten zudem in den oben erwähnten Unstimmigkeiten hinsichtlich Fasertypverschiebungen und des Bemühens unterschiedlicher Modelle zur Erklärung der Pathophysiologie der Spastizität. Eine Gruppe jedoch untersuchte spezifisch die Rolle, die das muskuläre Bindegewebe bei CP spielt, indem sie mittels Immunfluoreszenz den Kollagengehalt von Muskelbiopsien von Patienten mit CP untersuchte (Booth *et al.*, 2001). Hierbei konnte eine signifikante Korrelation zwischen MAS und Kollagen-Gehalt gezeigt werden. Zudem zeigten biohistochemische Untersuchungen eine vermehrte Anreicherung von Kollagen im Muskelendomysium von Patienten mit CP mit ebenfalls positiver Korrelation zum Schweregrad. Folgerichtig schlossen die Autoren, dass Kollagen in den Anstieg der Muskelsteifheit, die bei Patienten mit CP zu beobachten ist, involviert zu sein scheint.

Diese Beobachtungen lenken das Augenmerk des an der Pathophysiologie der CP Interessierten vom primären Ort der Schädigung, dem ZNS, über den zwischenzeitlichen Fixpunkt der Forschung, den Muskel, zum neuen Target: der extrazellulären Matrix. Ihr struktureller Hauptbestandteil ist das Kollagen und dessen krankhafte Anhäufung ist in anderen Organsystemen wohl bekannt: Fibrose.

### 2.2.3 Molekularbiologie der Fibrose und Atrophie

Der Extrazellularraum des menschlichen Körpers wird von organisiertem Gewebe ausgefüllt, das als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet wird. Die ECM besteht aus fibrösen Proteinen wie Kollagen, Elastin und Fibrillin, Adhäsionsmolekülen aus den Klassen der Immunglobuline, Integrine, Cadherine und Selektine, Proteoglykanen wie Decorin und Fibromodulin und Matrixmetalloproteinasen (MMP) (Raghow, 1994). Die ECM des Bewegungsapparates befindet sich in Sehnen sowie peri- und intramuskulär und fungiert als funktionelle Verbindung zwischen Muskel und Knochen. Wurde die ECM traditionell eher als statisch und inert angesehen, setzt sich langsam die Einsicht durch, dass es sich um Strukturen handelt, die sich sowohl funktionell als auch strukturell an vorherrschende, sich ändernde Anforderungen adaptieren (Banes *et al.*, 1999; D'Souza & Patel, 1999; Langberg *et al.*, 1999; Trotter, 1993). Verfeinerte in vivo-Techniken erlauben mittlerweile Einblick in die ECM des Skelettmuskels und das so entworfene Bild ist das eines lebenden und lebhaften Gewebes mit dynamischen Proteinumsatz und großer Anpassungsfähigkeit sowohl an systemische Veränderungen wie auch lokal an Über-, Unter- oder Fehlbelastungen. Dennoch ist die ECM des Muskels erstaunlich selten Gegenstand aktueller Forschung und kann als terra inkognita des Bewegungsapparates bezeichnet werden (Kjaer, 2004).

Die Aufgaben der ECM der Muskulatur, die zwischen 1-10% der Masse eines Muskels ausmacht (Fluck *et al.*, 1999; Jarvinen *et al.*, 2002; Lawson & Purslow, 2001) sind vielfältig: zum einen bietet es mechanische Unterstützung für Nerven und Gefäße, zum anderen sorgt es für die passive Elastizität des Muskels. Der im vorliegenden Zusammenhang wichtigste Faktor ist jedoch die Mechanotransduktion, also die Übertragung der vom Muskel generierten Kräfte auf die am Knochen inserierenden und ihn somit zur Bewegung zwingenden Sehne. Dies geschieht keineswegs nur longitudinal entlang des Sehnenverlaufes, sondern auch durch laterale Transmission zwischen benachbarten Fasern und Faszikeln innerhalb eines Muskels (Garfin *et al.*, 1981; Knight *et al.*, 1993; Maas *et al.*, 2001), stets in Adaption an die herrschenden Anforderungen, sowohl kurz- als auch mittel- und langfristig.

Die Rolle der fibrösen Proteine der ECM ist in erster Linie die der Kraftübertragung sowie des Aufbaus eines Netzwerks, das die eingebetteten Muskelzellen stützt. Adhäsionsmoleküle und hier in erster Linie die Integrine verbinden die ECM mit dem Cytoskelett und transduzieren somit externe Kräfte ins Innere der Zelle. Sie sind typischerweise Transmembranrezeptoren mit drei Domänen: einer intrazellulären, die mit dem Cytoskelett interagiert, einer transmembranösen und einer extrazellulären, die mit Adhäsionsmolekülen gleichen oder anderen Typs verbunden ist (homo- bzw. heterophile Bindung). Man vermutet, dass Integrine als Sensoren der Zugbelastungen der Zelloberfläche fungieren, sie werden zusammen mit dem Cytoskelett auch als mechanosensible Organelle bezeichnet. Zusammen mit Proteoglykanen sind sie in der Lage, Wachstumsfaktoren zu binden und ihren spezifischen Rezeptoren zu präsentieren. Die Matrixmetalloproteasen schließlich bauen die gegen unspezifische Proteasen resistenten Kollagenstrukturen ab im Sinne einer dynamischen Homöostase, vergleichbar den Osteoklasten des Knochens.

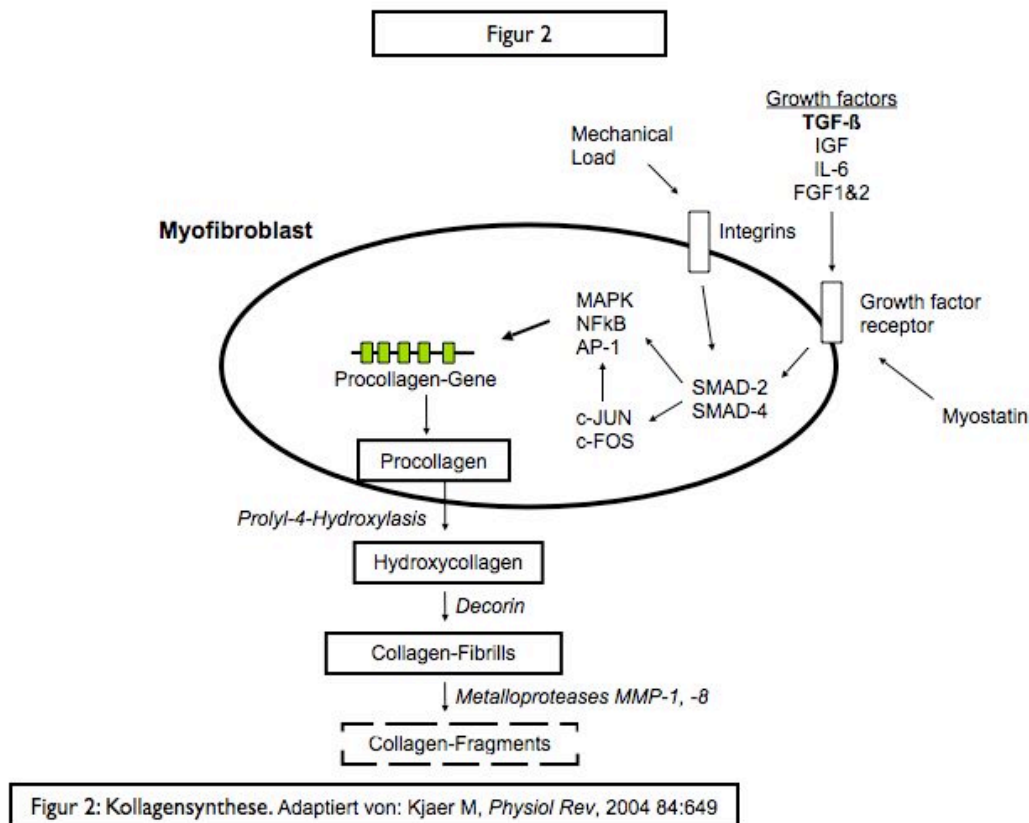
Die Kollagene stellen den Hauptbestandteil der fibrösen Proteine der ECM des Muskels dar, Elastin und Fibrillin spielen dagegen z. B. in retikulären Strukturen lymphatischer Organe oder der Lunge eine Rolle. Kollagen macht zwischen 25-35% der Gesamtproteinmenge des Körpers aus; es sind mindestens 20 verschiedene Kollagene bekannt (Myllyharju & Kivirikko, 2001), wobei Kollagen I bei weitem überwiegt (in Knochen, Haut, Muskel, Ligamenten und Sehnen). Im intramuskulären Bindegewebe sind im Wesentlichen die Kollagene I, III und IV (und zu einem geringen Anteil auch V) vorhanden, wobei Kollagen IV als netzwerkbildendes Kollagen auf die Basalmembran in unmittelbarer Nähe zum Sarkolemm und Zellmembran beschränkt ist, während Kollagen I und III als fibrilläre Kollagene die retikulären Schichten des Epi-, Peri- und Endomyiums dominieren. Kollagen II dagegen findet sich in hyalinem Knorpel, dem Nucleus pulposus der Zwischenwirbelscheiben und im Glaskörper des Auges. Die vorherrschende Rolle des Kollagen I wird unterstrichen durch Studien, die zeigen, dass Kollagen I im Muskel bis zu 97% des Kollagengehaltes ausmacht (Bailey *et al.*, 1979; Han *et al.*, 1999a).

Kollagen I besteht aus zwei alpha-1 Ketten und einer alpha-2 Kette, die von zwei verschiedenen Genen (COL1A1 bzw. COL1A2) kodiert werden, die auf den Chromosomen 17q21.31–22.05 (COL1A1) und 7q21.3–22.1 (COL1A2) liegen (Chu *et al.*, 1984). Die Ketten werden demzufolge in einer 2:1 Ratio produziert. Regulatorische Regionen innerhalb der Promotoren beider Gene enthalten stimulierende sowie supprimierende Elemente. Diverse Transkriptionsfaktoren interagieren mit diesen Elementen



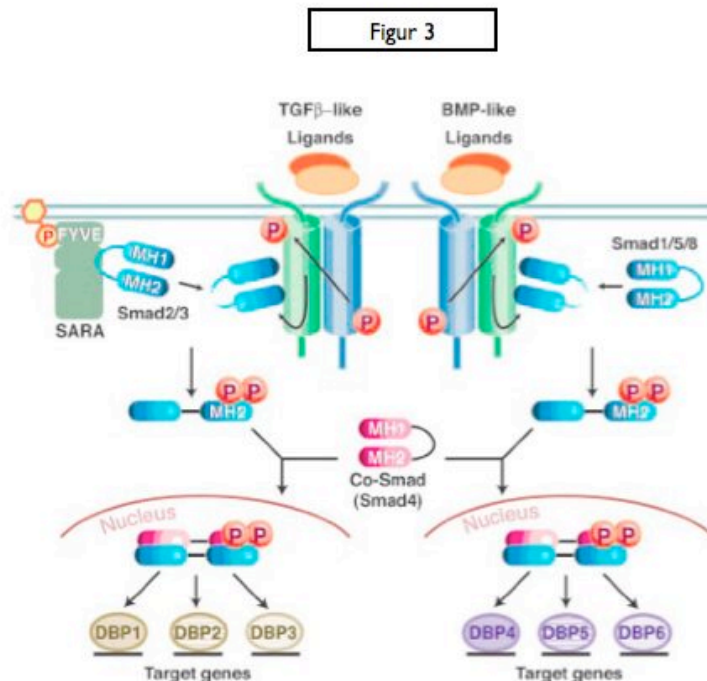
und kontrollieren sowohl die basale als auch die Zell-Typ spezifische, Cytokin-modulierte Genexpression (Goldberg *et al.*, 1992; Ihn *et al.*, 1996; Simkevich *et al.*, 1992). So wurden Cytokin-responsive Elemente für lösliche Faktoren wie TGF- $\beta$  oder TNF- $\alpha$  identifiziert; eine ganze Reihe löslicher Wachstumsfaktoren kann Fibroblasten zu erhöhter Kollagensynthese stimulieren (IL-1, IL-6, IL-8, IGF-1, FGF, NO, Prostaglandine, VEGF und PDGF) (Albrecht & Tidball, 1997; Almekinders & Temple, 1998; Bidder *et al.*, 2000; Hannon *et al.*, 1996; Rossert *et al.*, 2000). Kollagen wird von Muskel-stämmigen Myofibroblasten in membrangebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) produziert. Die Synthese der Kollagenfibrillen geschieht in mehreren Schritten: zunächst wird der entsprechende Abschnitt der nukleären DNA in m-RNA transkribiert, die anschließend durch Spleißen von ihren Intronen, also den nicht-kodierenden Sequenzen befreit und aus dem Zellkern ins Zytosol geschleust wird. Das bei der folgenden Translation entstandene Praeprokollagen wird ins Lumen des ER hinein synthetisiert und dort dann weiter prozessiert: Signalpeptide werden abgetrennt, dazu werden bestimmte Aminosäuren (Lysin und Prolin) in Vitamin-C abhängigen Reaktionen hydroxyliert, sowie Hydroxylysinreste glykolysiert. Die Polypeptide falten sich als linksgerichtete alpha-Ketten und die Bildung der quartären Struktur des Kollagens, der Trippel-Helix, wird aus jeweils zwei COL1A1 sowie einer COL1A2-Kette initiiert, die entstandene Struktur wird als Prokollagen bezeichnet. Diese Schritte sind unter anderem abhängig von der Prolyl-4-Hydroxylase (P-4-H), deren Aktivität mit der Rate der Kollagenbiosynthese steigt und fällt (Almekinders & Temple, 1998; Han *et al.*, 1999b). Anschließend wird es in Vesikel des Golgi-Apparates verpackt und durch Exozytose in die ECM sezerniert, danach extrazellulär durch Abspaltung von N- und C-terminalen Propeptiden in Kollagen überführt und dieses schließlich in stabile Fibrillen querverlinkt (Bornstein & Sage, 1989; Fraser *et al.*, 1979; Hulmes, 2002; Okuyama *et al.*, 1981; Traub *et al.*, 1969). Dem Proteoglykan Decorin scheint eine besondere Funktion in der Biosynthese des Kollagens zuzukommen: Versuche mit knock-out Mäusen konnten zeigen, dass Decorin in die Formation der Kollagenfibrillen involviert ist und deren Durchmesser zumindest teilweise zu kontrollieren in der Lage ist, sie zudem umgibt und somit laterale Fusion verhindert (Canty & Kadler, 2002; Danielsen *et al.*, 1998).

Die Degradation von Kollagen erfolgt extrazellulär durch die zur Gruppe der Kollagenasen gehörigen Matrixmetalloproteasen (MMP oder auch Matrixine), die ebenfalls von Fibroblasten produziert und sezerniert werden. Die Rolle der Matrixine in raschen Auf- und Abbauprozessen während Entzündung oder Verletzung ist beschrieben, während es über ihre Rolle in Adaptation an erhöhte mechanische Belastung noch wenige Daten gibt (Cleutjens *et al.*, 1995). Die Kollagenasen MMP-1 und -8 sind für den Abbau der Kollagene I und III zuständig, während MMP-2 und -9 nicht-fibrilläre Strukturen wie Kollagen IV degradieren. Die Rolle der Matrixine im Kontext pathologischer Muskelstimulation etwas erleuchten können Versuche, die zeigen, dass Immobilisation zu erhöhter Expression der MMP auf sowohl prä- wie auch posttranslationeller Ebene führen, somit erhöhten Kollagenumsatz signalisierend, während diese Prozesse zumindest teilweise durch Stretching reversibel sind. Die Regulation der MMP ist noch nicht gut erforscht, jedoch scheinen die mechanosensiblen Integrine eine wichtige Rolle zu spielen (Nagase & Woessner, 1999).



Während verminderte oder gestörte Kollagenbildung zu Krankheitsbildern wie denen der Osteogenesis imperfecta, des Ehler-Danlos-Syndroms, des Skorbuts und vielen anderen führen, ist exzessive Produktion von Kollagen I ein zentrales Merkmal von fibrotischen Erkrankungen von Lunge, Leber, Niere, Haut, Herz und Multisystemerkrankungen wie Sklerodermie und Hypertension (Trojanowska *et al.*, 1998; Varga & Jimenez, 1995). Diverse Studien konnten zeigen, dass die erhöhte Ablagerung von Kollagen I in fibrotischen Erkrankungen auf erhöhte Transkription der korrespondierenden Gene zurückzuführen ist (Verrecchia & Mauviel, 2004). Ein Wirkmechanismus scheint die durch mechanischen Stress verursachte Synthese und/oder Sezernierung von Wachstumsfaktoren zu sein, die auto- oder parakrine die Genexpression der ECM regulieren. Dieser Mechanismus scheint für Langzeit-Adaptationen der ECM an veränderte mechanische Beanspruchungen verantwortlich zu sein (Chiquet *et al.*, 2003). TGF- $\beta$  ist ein zentraler Regulator des Aufbaus und der Umgestaltung der ECM. Zum einen stimuliert er den Aufbau der ECM, zum anderen reduziert er deren Abbau: die Synthese von extrazellulären Proteinasen wird gehemmt, während die Produktion ihrer Inhibitoren sowie struktureller ECM-Bestandteile gesteigert wird. Die Wirkweise von TGF- $\beta$  auf involvierte Gene liegt auf Transkriptions-Ebene (Verrecchia & Mauviel, 2002), doch kann es auch die Stabilität der korrespondierenden mRNA erhöhen (Penttinen *et al.*, 1988). TGF- $\beta$  bindet an den TGF- $\beta$ -Rezeptor II, der daraufhin den TGF- $\beta$ -Rezeptor I durch Phosphorylierung aktiviert. Die beiden Rezeptoren formen einen Tetramer, der anschließend Signalproteine (Smad 2 und 3) aktiviert, die als Heterodimere zusammen mit Smad 4 in den Zellkern wandern und dort die Zielgene entweder durch direkte Interaktion aktivieren oder modulieren oder aber mit dem Transkriptions-Komplex interagieren (Hu *et al.*, 1998; Roberts, 1999; Zhang

& Derynck, 1999). Über die Proteine der Smad-Gruppe scheint auch die Verbindung zwischen TGF- $\beta$  und veränderter Expression von Kollagen erklärt: die Proteine c-Jun und c-Fos bilden gemeinsam den Transkriptionsfaktor AP-1, der von Smad-Proteinen aktiviert wird und für den ein responsives Element im Promotor von Kollagen 1 existiert mit spezifischen Bindungsmotiven für AP-1:



Figur 3: TGF- $\beta$  signalling. Adaptiert von: Attisano L, *Science*, 2002, 5573:1646

Erhöhte mechanische Beanspruchung der Muskulatur führt sowohl beim Menschen wie auch im Tierversuch zu einer Netto-Mehrproduktion von Prokollagen und vermehrter Prozessierung zu unlöslichem Kollagen, aber auch zur Anhäufung von anderen Bestandteilen der ECM (Kjaer, 2004). Die Literatur ist doch äußerst lückenhaft, was die pathologische Stimulation, die Spastizität mit sich bringt, und deren Auswirkung auf die ECM betrifft. Fibrose zeigte sich in diversen Versuchen und unterschiedlichen Organsystemen als von TGF- $\beta$  abhängig (Butt & Bishop, 1997; Parsons *et al.*, 1999). Es gibt starke Evidenz für die lokale Freisetzung von TGF- $\beta$  aus Fibroblasten in unterschiedlichen Geweben (Knochen, Muskel, Sehne, vermutlich auch Herzmuskel und Gefäße), die mechanisch vermehrt beansprucht werden (Kjaer, 2004). Zudem ist mechanischer Stress nicht nur in der Lage, die Sezernierung von TGF- $\beta$  zu stimulieren, sondern auch die Transkription auf Genebene zu erhöhen. Die Funktion von TGF- $\beta$  scheint dabei mit der eines zweischneidigen Schwertes vergleichbar: kurzfristige Erhöhung in z. B. erhöhter mechanischer Beanspruchung ist physiologisch, während langfristige Erhöhung zur Fibrosierung des Gewebes führt (Leask *et al.*, 2002). Die Bedeutung von TGF- $\beta$  wird auch unterstrichen durch Experimente mit TGF- $\beta$ -Antiserum, das TGF- $\beta$  neutralisiert und in der Lage war, in fibrotischen Erkrankungen von Niere, Lunge, Haut, Gehirn, Gelenken sowie Arterien die exzessive extrazel-

luläre Deposition von Kollagen zu verhindern. Die erhöhte Expression von TGF- $\beta$  und Kollagen I konnte hierbei korrespondierend auf m-RNA wie auf Protein-Ebene gezeigt werden (Agocha *et al.*, 1997; Anders *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 1996; Sheehan & Allen, 1999).

Die bei Patienten mit CP beobachtete Atrophie der betroffenen Muskulatur (Ohata *et al.*, 2008) ist bisher noch nicht molekularbiologisch untersucht worden, jedoch zuletzt mittels MRT-Untersuchungen bestätigt worden (Oberhofer *et al.*, 2010). Myostatin (auch genannt growth differentiation factor 8, GDF8) wird von Skelettmuskelzellen sezerniert und inhibiert auto- und parakrin deren Wachstum (Carnac *et al.*, 2006; Gonzalez-Cadavid & Bhasin, 2004). In Modellen von Atrophie der Skelettmuskulatur (Glukocorticoid-induziert bzw. durch porto-cavale Anastomosen) konnte Myostatin als ein empfindlicher Parameter des Verlustes an Skelettmuskel identifiziert werden, sowohl auf m-RNA-Ebene wie auch auf Protein-Niveau. Myostatin interagiert ähnlich TGF- $\beta$  über Oberflächenrezeptoren mit nachgeschalteten Signalkaskaden, die die Proteine der Smad-Gruppe involvieren (Dasarathy *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003).

### **2.3 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit**

Die Gruppe der Cerebralparesen ist schon lange beschrieben. Bereits in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts begann man, den Muskel - fernab des Gehirns als dem Ort der primären Schädigung - als Organ einer pathologischen Veränderung bei Cerebralparesen zu verstehen und zu untersuchen. Histopathologische Untersuchungen, zumeist durchgeführt an der spastischen Muskulatur erwachsener Schlaganfallpatienten, konnten eine Vielzahl an Veränderungen zeigen, jedoch keine spezifischen. Weder das Modell der Über- noch das der Unterbeanspruchung schien zufrieden stellend mit dem histopathologischen Befund übereinzustimmen. Eine einzige Arbeit wurde gefunden, die immunhistochemisch die Muskulatur von Kindern mit CP untersuchte (Booth *et al.*, 2001): diese konnte eine pathologische Anhäufung von Kollagen nachweisen, jedoch ließen sich methodologisch weder die Anhäufung auf molekularem Niveau bestätigen noch Ursachenforschung im Sinne gestörter Regulation der Expression von Kollagen betreiben. Keine einzige Arbeit wurde gefunden, die sich mit der Anhäufung von Kollagen im Muskel bei CP auf molekularer Ebene beschäftigt.

Hypothesen der vorliegenden Arbeit waren:

- 1.) Die Akkumulation von Kollagen in der Muskulatur von Patienten mit CP geht einher mit einer Überexpression der Kollagene auf mRNA-Ebene.
- 2.) Regulatoren der Kollagenbiosynthese und -prozessierung sind ebenfalls in ihrer Expression verändert.
- 3.) Die Expression der Kollagenbiosynthese und -prozessierung sowie deren Regulatoren ist altersabhängig verschieden.
- 4.) Die Expression der Kollagenbiosynthese und -prozessierung sowie deren Regulatoren unterscheidet sich je nach Ausmaß der körperlichen Beeinträchtigung (evaluiert anhand des GMFCS).

5.) Die Behandlung des Muskels mit Botulinumtoxin hat Einfluss auf die Kollagenexpression.

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (gemäß der Deklaration von Helsinki (Rickham, 1964) über die ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen, zuletzt revidierte Version der World Medical Association in Seoul 2008) genehmigt. Die Patienten der vorliegenden Studie unterzogen sich zwischen 2004 und 2011 einer geplanten orthopädischen Operation (Sehnenverlängerung, -verlagerung und/oder Umstellungsosteotomie) als Teil der Behandlung sekundärer Folgen ihrer Grunderkrankung. Sämtliche Patienten hatten das klinische Bild einer Cerebralparese. Die Operationen wurden am Zentrum für Kinder- und Neuroorthopädie der orthopädischen Klinik München-Harlaching durchgeführt, mit dessen Leiter, Dr. med. Peter Bernius, während der Zeit der Probenentnahmen eine Kooperation bestand. Die Eltern und, soweit möglich, die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis (siehe Studienblatt 1). Ab dem Zeitpunkt der Probenentnahme wurden die einzelnen Proben kodiert und anonymisiert weiterverarbeitet, siehe Tabelle 3.

Studienblatt 1:

## Klinikum der Universität München

Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen

Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Zentrum Pädiatrische Neurologie und Entwicklungsneurologie

Leiter: Prof. Dr. med. Florian Heinen

Klinikum der Universität München • Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Lindwurmstraße 4 • D-80337 München

Name:

Geburtsdatum:

**Ansprechpartner: Ingo Borggräfe, Assistenzarzt**

Zentrum Pädiatrische Neurologie und

Entwicklungsneurologie

Telefon: 089/5160-7851 Telefax: 089/5160-7745

E-Mail: Ingo.Borggraeffe@helios.med.uni-muenchen.de

### **Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung für Eltern und Patienten zur Studie mit dem Titel „Mechanismen chronischer Umbauvorgänge im Muskel bei Kindern mit spastischer Zerebralparese“**

#### **Studie**

Die vorliegende Studie mit dem o.g. Titel soll dem besseren Verständnis der Entstehung von Spätkomplikationen bei Kindern mit Zerebralparese dienen. Diese sogenannten Spätkomplikationen umfassen im Wesentlichen krankhafte Umbauprozesse im Muskel, die erstens zum Muskelabbau und zweitens zur ausgeprägten Verhärtung und Verkürzung der Muskulatur führen. Verhärtung und Verkürzung führen im Verlauf schließlich zu krankhaften knöchernen Gelenkveränderungen und Wirbelsäulenschiefständen. Letztere begünstigen ständige und bisweilen lebensgefährliche Infekte der unteren Atemwege. Der Muskelabbau führt insbesondere bei Kindern mit schwerer Spastizität zu einer allgemeinen Schwäche mit Leistungsabbau.

Ihr Kind unterzieht sich einer geplanten Operation zur Verbesserung von Gelenkfehlstellungen. Dabei soll etwas Muskelgewebe (ca. linsengroß) gewonnen werden. Die Gewebeentnahme erfolgt während der geplanten Operation. Da dabei allein durch die Operationstechnik etwas Muskelgewebe anfällt, muss kein Extragewebe entnommen werden. Das Operationsrisiko wird damit nicht beeinflusst.

Wir werden aus den Gewebestücken Kopien des Erbmateri als (DNA) isolieren und dadurch indirekt den Gehalt bestimmter Stoffe im Muskel messen. Das eigentliche Erbmaterial (DNA) bleibt unberührt, d.h. es werden keine direkten Untersuchungen oder Veränderungen am Erbmaterial (DNA) durchgeführt werden. Darüber hinaus werden wir Funktionen und Gehalt verschiedener Eiweißstoffe biochemisch und mit dem Mikroskop untersuchen. Ferner sollen Bindegewebszellen des Muskels sowie Muskelzellen isoliert werden und hinsichtlich ihrer Rolle bei der Entstehung der krankhaften Muskelveränderungen untersucht werden.

Im optimalen Fall werden wir Veränderungen finden, die uns die krankhaften Umbauprozesse erklären könnten. Mit diesem Verständnis wäre ein erster Schritt gebahnt, langfristig neue medikamentöse Therapien zu entwickeln, die diese Umbauprozesse beeinflussen könnten.

#### **Datenschutz und Anonymisierung**

Die Muskelgewebeproben werden in auswärtigen Kliniken gesammelt und in einem Forschungslabor im Dr. von Haunerschen Kinderspital verarbeitet. Die Proben werden fortlaufend nummeriert und lediglich mit folgenden Informationen dorthin versandt: Alter in Jahren, Geschlecht und Schweregrad der Spastizität. Es werden dort also keine persönlichen Daten des Patienten (Name, Geburtsdatum) bekannt. Dadurch ist eine Zuordnung von Probe zu den persönlichen Patientendaten nicht mehr möglich (unwiderrufliche Anonymisierung).



Alle an der Studie beteiligten Personen sowie autorisierte Prüfer von in- und ausländischen Gesundheitsbehörden haben im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen der Patient namentlich genannt wird. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet.

Die Weitergabe der Daten im In- und Ausland erfolgt ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken. Der Patient wird dabei ausnahmslos namentlich **nicht** genannt. Letzteres gilt auch für Veröffentlichung der Studienergebnisse.

Die Teilnahme an der Studie ist **freiwillig**. Die sorgeberechtigten Eltern und/ oder Kinder haben jederzeit das Recht, ohne Angaben von Gründen die Einwilligung zurückzuziehen.

#### **Einverständniserklärung**

Hiermit erklären wir uns damit einverstanden, dass im Rahmen der geplanten Operation Gewebe wie oben beschrieben entnommen wird.

---

Name des Elternteils

Ort, Datum

Unterschrift

---

Name des Patienten

Ort, Datum

Unterschrift

---

Name der aufklärenden Arztes

Ort, Datum

Unterschrift



Die Patienten wurden klinisch untersucht und dem Studienblatt entsprechend (siehe Studienblatt 2) eingestuft. Dabei wurden Alter, Geschlecht, Niveau der motorischen Beeinträchtigung anhand des GMFCS sowie Diagnose und deren Ätiologie festgehalten. Des Weiteren wurden für die einzelnen Proben der Entnahmeort aus dem Muskel, der Schweregrad der Spastizität des jeweiligen Muskels anhand der MAS sowie der Bewegungsumfang der vom Muskel bewegten Gelenke aufgenommen. Muskeln, die innerhalb des letzten Jahres vor der Operation mindestens dreimal mit Botulinumtoxin A behandelt wurden, wurden als „BTX-positiv“ vermerkt. Nicht mit Botulinumtoxin behandelte Muskeln wurden dementsprechend als „BTX-negativ“ geführt. Muskeln, die bereits mit Botulinumtoxin behandelt waren, jedoch nicht hinreichend oft, vor längerer Zeit oder mit Botulinumtoxin B, wurden nicht in die Studie inkludiert. Ebenfalls exkludiert wurden Patienten, bei denen zwar nicht der unmittelbare Zielmuskel, aber ein benachbarter Muskel mit Botulinumtoxin behandelt worden war. Diese Maßnahme wurde ergriffen, da zu wenig über das Diffusionsverhalten von Botulinumtoxin über Faszien der menschlichen Muskulatur bekannt ist (Gracies, 2004).

Studienblatt 2:

Klinikum der Universität München  
Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen  
Kinderspital  
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt



Zentrum Pädiatrische Neurologie und Entwicklungsneurologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Florian Heinen

Klinikum der Universität München • Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Lindwurmstraße 4 • D-80337 München

e-mail [Ingo.Borggraefe@med.uni-muenchen.de](mailto:Ingo.Borggraefe@med.uni-muenchen.de)

Send to:

**Sample #:**

Ingo Borggraefe, M.D.  
Dr. von Haunersches Kinderspital  
University of Munich  
Lindwurmstr. 4  
D-80337 Munich

Date:

### Differential gene expression in muscle of patients with cerebral palsy

#### Patient data

Age:                      years                      Sex:    ☐ male    ☐ female  
Level of gross motor function (see enclosed description): GMFCS level    ☐ I    ☐ II    ☐ III    ☐ IV    ☐ V  
Principle Diagnosis:    Spastic Tetraplegia    ☐  
                                 Spastic Diplegia    ☐  
                                 Spastic Hemiplegia    ☐

Etiology:

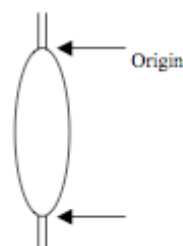
#### Specimen specification

Muscle:

Muscle treated with Botulinum Toxin (BoNT/A)?    ☐ yes    ☐ no

Location of biopsy (please note in the figure):

Date of collection:



Level of spasticity (mod. Ashworth Scale): 0 ☐    1 ☐    +1 ☐    2 ☐    3 ☐    4 ☐

Joint:                      ROM (active):                      ROM (passive):

Please feel free to contact us any time by telephone xx49-89-5160-7851 or by email ([Ingo.Borggraefe@med.uni-muenchen.de](mailto:Ingo.Borggraefe@med.uni-muenchen.de)) if you have any question.

F. Heinen, M.D.,

I. Borggraefe, M.D.

J. Böhmer, cand. med.

Professor of Medicine

Anschrift: D-80337 München • Lindwurmstraße 4 • Telefon (0 89) 51 60-0 (Vermittlung)  
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder 58 bis Haltestelle Goetheplatz



Macintosh HD/Users/Jens/Desktop/Promotion/Anhang/Studie/Anlage 2.doc – 1/1 – 1141

Tabelle 3: Probenliste

ID #	Muskel	Alter	Sex	Diagnose	Ätiologie	GMFCS	MAS	BoNT
ha-s1	M. biceps femoris	10	m	BS-CP	FG 28.SSW	III	3	ja
ha-s2	M. gastrocnemius li	9	m	BS-CP	FG	III	3	ja
ha-s3	M. gracilis li	16	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s4	M. gracilis li	16	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s5	M. vastus med.	13	m	BS-CP	posttraumatisch	III	3	nein
ha-s6	M. vastus lat.	10	m	BS-CP	FG	III	3	nein
ha-s7	M. semimembranosus	13	m	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s8	M. semitendinosus	13	m	BS-CP	FG 31. SSW	III	3	nein
ha-s9	M. biceps femoris re	9	w	BS-CP	FG 29.SSW	IV	3	ja
ha-s10	M. semimembranosus re	9	w	BS-CP	FG 29.SSW	IV	3	ja
ha-s11	M. biceps femoris li	9	w	BS-CP	FG 29.SSW	IV	3	ja
ha-s12	M. biceps femoris li	9	w	BS-CP	FG 29.SSW	IV	3	ja
ha-s13	M. gastrocnemius li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s14	M. gracilis re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s15	M. semitendinosus re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s16	M. semimembranosus re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s17	M. gracilis li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s18	M. semimembranosus li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s19	M. gastrocnemius re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s20	M. semitendinosus li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein

ha-s21	M. biceps femoris li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s22	M. vastus lat. re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s23	M. vastus lat. li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s24	M. rectus fem. re	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s25	M. rectus fem. li	6	w	BS-CP	FG 31.SSW	III	3	nein
ha-s26	M. gastrocnemius li	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s27	M. semitendinosus re	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s28	M. gracilis li	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s29	M. semimembranosus li	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s30	M. semimembranosus re	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s31	M. rectus fem. re	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s32	M. rectus fem. li	6	m	BS-CP	posttraumatisch	IV	3	nein
ha-s35	M. gastrocnemius li	12	m	BS-CP	FG	III	4	nein
ha-s36	M. semimembranosus re	12	m	BS-CP	FG	III	4	nein
ha-s37	M. gastrocnemius re	12	m	BS-CP	FG	III	4	nein
ha-s38	M. gastrocnemius re	4	w	BS-CP	posttraumatisch	III	2	ja
ha-s39	M. semimembranosus re	4	w	BS-CP	posttraumatisch	III	2	ja
ha-s40	M. gastrocnemius re	7	m	BS-CP	FG 32. SSW	III	2	nein
ha-s41	M. semimembranosus li	7	m	BS-CP	FG 32. SSW	III	2	nein
ha-s42	M. semimembranosus re	7	m	BS-CP	FG 29.SSW	III	3	ja
ha-s43	M. semimembranosus li	7	m	BS-CP	FG 29.SSW	III	3	ja
ha-s44	M. gastrocnemius li	7	m	BS-CP	FG 29.SSW	III	3	ja
ha-s45	M. gastrocnemius li	17	w	BS-CP	FG	II	3	nein
ha-s46	M. biceps fem. li	9	m	BS-CP	FG 31. SSW	II	2	nein

ha-s47	M. semitendinosus li	9	m	BS-CP	FG 31. SSW	II	2	nein
ha-s48	M. gastrocnemius li	9	m	BS-CP	FG 31. SSW	II	2	nein
ha-s49	M. semimembranosus li	9	m	BS-CP	FG 31. SSW	II	2	nein
ha-S50	M.gastrocnemius li	12	m	BS-CP	FG 32. SSW	I	1	ja
ha-S51	M. semimembranosus li	12	m	BS-CP	FG 32. SSW	I	1	nein
ha-S52	M. semitendinosus li	15	m	BS-CP	FG 31.SSW	V	4	nein
ha-S53	M. semimembranosus li	15	m	BS-CP	FG 31. SSW	V	4	nein
ha-S54	M. biceps femoris li	12	w	BS-CP	FG 26. SSW	V	4	nein
ha-S55	M. semimembranosus li	12	w	BS-CP	FG 26. SSW	V	4	nein
ha-S56	M. semimembranosus re	12	w	BS-CP	FG 26. SSW	V	3	nein
ha-S57	M. biceps femoris re	12	w	BS-CP	FG 26. SSW	V	3	nein
ha-S58	M. semimembranosus re	4	m	BS-CP	FG.23SSW	V	3	nein
ha-S59	M. gracilis re	4	m	BS-CP	FG.23SSW	V	3	nein
ha-S60	M. biceps fem. re	4	m	BS-CP	FG.23SSW	V	3	nein
ha-S61	M. biceps fem. li	15	w	BS-CP	FG	IV	3	ja
ha-S62	M. psoas li	2	w	BS-CP	FG	I-II	1	nein
ha-S63	M. gracilis re	7	m	BS-CP	FG	III	3	ja
ha-S64	M. biceps fem.re	7	w	BS-CP	FG 33.SSW	III	3	ja
ha-S65	M. semimembranosus	7	w	BS-CP	FG 33.SSW	III	3	ja
ha-S66	M. semimembranosus re	7	w	BS-CP	FG	II	3	ja
ha-S67	M. gastrocn. re	7	w	BS-CP	FG	II	3	ja
ha-S68	M. semimembranosus. Li	10	m	BS-CP	FG	II	3	nein
ha-S69	M. semimembranosus re	10	m	BS-CP	FG	II	2	nein

ha-S70	M. gastrocnemius. li	10	m	BS-CP	FG	II	3	nein
ha-S71	M. gastrocn. re	10	m	BS-CP	FG	II	2	nein
ha-S72	M. semimembranosus re	5	m	BS-CP	FG 26. SSW	IV	4	ja
ha-S73	M. gastrocnemius re	5	m	BS-CP	FG 26. SSW	IV	4	ja
ha-S74	M. semimembranosus re	6	m	BS-CP	FG	III	3	ja
ha-S75	M gastrocnemius re	6	m	BS-CP	FG	III	2	ja
ha-S76	M. semimembr. prox re	5	w	BS-CP	Asphyxie	V	4	nein
ha-S77	M. semimembr. dist re	5	w	BS-CP	Asphyxie	V	4	nein
ha-S78	M. gastrocn. re	10	m	BS-CP	postpartaler HKS	IV	4	nein
ha-S79	M. semimebr. re	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	IV	4	ja
ha-S80	M. gastrocn. re	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	IV	4	ja
ha-S81	M. semimembr. li	5	m	BS-CP	FG 27. SSW	IV	3	nein
ha-S82	M. semimembr. re	5	m	BS-CP	FG 27. SSW	IV	3	nein
ha-S83	M biceps femoris re	9	m	BS-CP	FG 30. SSW	V	3	ja
ha-S84	M. biceps fem. re	13	m	BS-CP	intrauteriner O2- Mangel	IV	4	ja
ha-S85	M. semimembranosus re	13	m	BS-CP	intrauteriner O2- Mangel	IV	4	ja
ha-S86	M. soleus re	13	m	BS-CP	intrauteriner O2- Mangel	IV	3	ja
ha-S87	M. semimembranosus re	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	2	nein
ha-S88	M. biceps fem re	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	2	nein
ha-S89	M. semimembranosus li	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	3	nein
ha-S90	M. biceps fem li	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	3	nein
ha-S91	M gastrocnemius re	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	3	nein

ha-S92	M. gastrocnemius li	5	w	BS-CP	FG 30. SSW	II	3	nein
ha-s94	M. semimembranosus re	6	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s95	M. gastrocnemius li	6	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	4	ja
ha-s96	M. semimembranosus li	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s97	M. biceps femoris li	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s98	M. biceps femoris re	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s99	M. semimembranosus re	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s100	M. gastrocnemius re	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s101	M. gastrocnemius li	7	m	BS-CP	FG 27. SSW	I	2	ja
ha-s102	M. semimembranosus li	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	nein
ha-s103	M. semitendinosus li	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	nein
ha-s104	M. biceps femoris li	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	nein
ha-s105	M. semimembranosus re	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	4	nein
ha-s106	M. semitendinosus re	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	4	nein
ha-s107	M. gastrocnemius li	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	nein
ha-s108	M. gastrocnemius re	9	m	BS-CP	FG 34. SSW	IV	4	nein
ha-s109	M. semimembranosus re	10	m	BS-CP	Asphyxie	IV	3	nein
ha-s110	M. semitendinosus re	10	m	BS-CP	Asphyxie	IV	3	nein
ha-s111	M. biceps fem. li	10	m	BS-CP	Asphyxie	IV	3	nein
ha-s112	M. biceps fem. re	10	m	BS-CP	Asphyxie	IV	3	nein
ha-s113	M. Semitendinosus li	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein
ha-s114	M. semitendinosus re	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein
ha-s115	M. semimembranosus li	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein
ha-s116	M. semimembranosus	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein

	re							
ha-s117	M. biceps fem. re	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein
ha-s118	M. biceps fem. li	16	m	BS-CP	FG 26. SSW	III	4	nein
ha-s119	M. gastrocnemius li	4	w	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	ja
ha-s120	M. gastrocnemius re	4	w	BS-CP	FG 34. SSW	IV	3	ja
ha-s121	M. semitendinosus li	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	4	ja
ha-s122	M. semimembranosus li	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	4	ja
ha-s123	M. semitendinosus re	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	4	ja
ha-s124	M. semimembranosus re	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	4	ja
ha-s125	M. gastrocnemius re	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	3	ja
ha-s126	M. gastrocnemius li	9	m	BS-CP	connatale CMV- Infektion	IV	3	ja

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Muskelbiopsie

Während der Operation wurden vom Operateur offene Biopsien an den vorgegebenen Muskeln vorgenommen. Das linsengroße Stück Muskulatur wurde aus dem Muskelbauch steril entnommen, in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.2.2 Gewinnung der m-RNA

Zur Bearbeitung der Biopsien wurde das RNeasy<sup>®</sup> Fibrous Tissue Kit (Catalog no. 74704) der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Schritte zur Gewinnung der RNA wurden an einem reinen RNA-Arbeitsplatz und in mit DEPC (Diethyl-Pyrocyanat) behandelten Gefäßen (Gauthier & Ven Murthy, 1987) durchgeführt. Maximal 4 Biopsien wurden gleichzeitig verarbeitet. Die Proben wurden in 300µl mit 1% β-Mercaptoethanol (β-ME) versetztem Lyse-Puffer mit Guanidin-Isothiocyanat (RLT, Fa. Qiagen, Hilden) überführt. Nach Disruption der Zellmembranen und Homogenisierung der Zellsuspension in einem Rotor-Stator-Dispergiergerät (Ultra Turrax T18<sup>®</sup>, Fa. IKA Analysetechnik, Staufen) wurden 590µl RNase-freies Wasser und 10µl Proteinase K hinzugefügt und 10 Minuten bei 55°C inkubiert.



Durch 3-minütige Zentrifugation bei 10.000g wurde der Debris entfernt, die verbleibenden ca. 900µl wurden mit 450µl reinen Ethanols verdünnt. 700µl dieser Lösung wurden in eine RNeasy Mini Spin Column des Kits pipettiert und 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Dieser Schritt wurde mit der restlichen Lösung wiederholt. Anschließend wurde 350µl Waschpuffer (RW1) zugegeben. Die Lösung wurde nun mit 80µl einer Mischung aus 70µl Puffer (RDD) und 10µl DNase versetzt und 15 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000g wurden 500µl eines zweiten Wasch-Puffers (20% RPE, versetzt mit Ethanol) appliziert und 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Zuletzt wurden 40µl RNAase-freies Wasser direkt auf die Membran der Mini Spin Column gegeben und die RNA 1 Minute bei 8000g eluiert.

### 3.2.3 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch. Hierzu wurden 6µl des RNA-Stocks mit 24 µl Wasser vermischt und dreimal die Extinktion bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Der Gehalt an RNA wurde bei  $A_{260}$ , der Reinheitsgrad über den Quotienten  $A_{260/280}$  bestimmt (Goodrich *et al.*, 2007). Quoten zwischen 1,9 und 2,1 wurden als gut erachtet. Die Ergebnisse wurden gemittelt, die Proben bei -80°C verwahrt. Für die Tabelle der gemessenen Extinktionen siehe Anlage 3.

### 3.2.4 Primerdesign

Um DNA zu vervielfältigen, sind außer einer Matrize, ihren Grundbausteinen (den Nukleotiden Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin) noch Enzyme notwendig, ohne die die Vervielfältigung um viele Größenordnungen langsamer ablaufen würden: DNA-Polymerasen. Um nicht die gesamte DNA, sondern nur bestimmte, im jeweiligen Experiment interessante Abschnitte zu vervielfältigen, macht man sich eine Eigenart der dabei verwendeten Polymerase zunutze: Die Polymerase kann nicht direkt auf „nackter“ DNA arbeiten, sie benötigt eine Starthilfe. Diese besteht in der Natur wie im Labor aus Primern, also wenige Basenpaare langen DNA- (Labor) oder RNA- (Natur) Molekülen, die zu bestimmten Teilen der Vorlagen-DNA komplementär sind, sich also anlagern. An diesen Primern kann die Polymerase ansetzen und die weitere Synthese des neuen Strangs vorantreiben. Wenn man nun die Basensequenz eines bestimmten Genes kennt, kann man Primer entwickeln, die in diesem Gen binden. Mithilfe leistungsfähiger Suchmaschinen kann mittlerweile auch untersucht werden, ob der entwickelte Primer spezifisch ist, das heißt nur im Gen des Interesses bindet. Die dann neu synthetisierte DNA wird somit aus Kopien desjenigen Abschnittes der DNA bestehen, die man vorher ausgesucht hatte.

Das Primerdesign wurde individuell für jedes einzelne zu untersuchende Gen durchgeführt: Zunächst wurde unter Zuhilfenahme der Funktion „gene“ der Internetpräsentation des NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, MD, USA ) (Wheeler *et al.*, 2005) das zu untersuchende Gen identifiziert sowie auf seine Eigenschaften untersucht (Sicherstellung humanen Ursprungs, Vorkommen von Spleißvarianten, Länge). Mittels der Funktion „nucleotide“ wurden die für das jeweilige Gen kodierenden Basensequenzen gefunden und extrahiert. Über das Online-Tool „Primer3“ (Rozen & Skaletsky, 2000) der Firma Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA wurden die Primer schließlich erstellt. Hierbei wurde Wert auf folgende Parameter gelegt: 1.) es wurden zwei Primer pro Gen gewählt, entsprechend der doppelsträngigen Natur des DNA-Stranges: ein 3'-5'-Primer (forward primer) sowie ein 5'-3'-Primer (reverse primer). 2.) die Primer wurden Exon-übergreifend gewählt (nahezu jedes Gen bestand aus mehreren Exonen), um die fälschliche Identifizierung von Spleißvarianten auszuschließen sowie keine Amplifizierung genomischer DNA im Falle der Verunreinigung der Proben zu erhalten. 3.) Die Ziellänge der Primer wurde zwischen 18-22 Basenpaaren gewählt, um ausreichende Spezifität bei gleichzeitig guten Bindungseigenschaften zu gewährleisten. 4.) Die Schmelztemperatur der Primer wurde zwischen 52°C und 58°C gewählt. 5.) Es wurde ein ausreichend hoher Gehalt an Guanin/Cytosin (GC) Basen erreicht (>40%). 6.) Es wurde Wert auf eine GC-clamp gelegt, um die Bindungseigenschaften zu verbessern. 7.) Störende sekundäre und tertiäre Strukturen (hairpins, self-dimers, cross-dimers) wurden minimiert. 8.) Die Länge des bei der Amplifizierung entstehenden Produktes wurde zwischen 100 und 400 Basenpaaren gewählt. 9.) Die Produkte wurden mittels der Funktion „blast“ des NCBI überprüft um sicherzustellen, dass die Primer nicht auch ein anderes Gen binden.

Anschließend wurden die Primer bei der Firma metabion international AG in Martinsried bestellt und bei -20°C verwahrt.

### 3.2.5 cDNA-Synthese

Die bei der Verarbeitung der Muskelproben gewonnene RNA ist durch das ubiquitäre Vorhandensein von RNAsen relativ instabil und selbst bei -80°C nur begrenzt haltbar. Ihre Verfügbarkeit für direkte Messungen ist daher gering. Wesentlich eleganter ist die Umwandlung der RNA in stabilere Moleküle bei gleichzeitig beibehaltener Information. DNA ist das Molekül der Wahl und praktischerweise existiert in der Natur bereits ein Enzym, das bei diesem Vorgang von entscheidender Bedeutung ist: Sogenannte Retro-Viren (zu denen auch das HI-Virus zählt) besitzen das Enzym reverse Transkriptase. „Normale“ Transkriptasen besitzt und benötigt jede Lebensform mit eigenem Stoffwechsel, Pro- wie Eukaryoten: sie schreiben die Information der DNA um in RNA, die anschließend als Vorlage für die Proteinbiosynthese dienen. Die Vorlage „normaler“ Transkriptasen ist also immer DNA, die Vorlage der reversen Transkriptase ist jedoch RNA, die in DNA umgewandelt wird. Wird die reverse Transkriptase im Labor für die Umwandlung von RNA in DNA verwendet, nennt man das Ergebnis cDNA („complementary DNA“, komplementäre DNA). Bei der Synthese von cDNA diente die RNA aus den Muskelproben als Matrize. Auch die reverse Transkriptase benötigt Primer als Startpunkt, um synthetisieren zu können. Aus diesem Grund enthält der Reaktionsmix von cDNA-Synthese-Kits eine Vielzahl an Primern, um unselektiv alle RNA umzuschreiben. Es wurden jeweils 200ng RNA verwendet, die entsprechend der Herstellerangaben des iScript™ cDNA Synthesis Kits der Firma Bio-Rad in München mit H<sub>2</sub>O verdünnt wurden (Hindle *et al.*, 2009). Anschließend wurden der Reaktionsmix sowie die reverse Transkriptase hinzugefügt und 5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und schließlich 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.6 konventionelle PCR

Um die synthetisierten Primer zu testen, wurde jedes Primerpaar in konventioneller PCR angewendet. Des Weiteren wurde auch jede gewonnene cDNA mit dem Standardprimer Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) getestet. Hierzu wurde der iQ™ Supermix (McCoy *et al.*) der Firma Bio-Rad in München verwendet. Auf 10 µl des iQ™ Supermix kam 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer, 7 µl H<sub>2</sub>O sowie 1 µl genomische DNA. Die Lösung wurde anschließend zuerst 2 Minuten auf 95°C erwärmt und dann 30 Zyklen lang prozessiert: 30 Sekunden bei 95°C, 1 Minute bei 58°C, 1 Minute bei 72°C. Anschließend noch 7 Minuten bei 72°C, Verwahrung vor weiterer Verwendung bei 4°C.

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Gel-Elektrophorese getestet: hierzu wurden 2% Agarose-Gele verwendet (2g Agarose auf 100ml TBE-Puffer). 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl Formamid-Puffer gemischt und 40 Minuten bei 120V Spannung im Gel laufen gelassen. Um eine Kontrolle hinsichtlich des zu erwartenden Produkts zu ermöglichen, wurde gleichzeitig der DNA Molecular Weight Marker V der Firma Roche, Indianapolis, IN, USA eingesetzt (Lee *et al.*, 2004). Das Gel wurde anschließend unter einer UV-Lampe fotografiert und die entstandenen Banden in Bezug auf die zu erwartenden Lauflängen und Doppelbanden untersucht. Zum einen mussten bei Abweichungen Fehler in der Laborarbeit ausgeschlossen werden, zum anderen folgende Fehler: 1.) Nicht funktionabler Primer, sichtbar durch die fehlende Bande in der Elektrophorese. 2.) Das Vorhandensein von Spleißvarianten des Zielgens, also verschiedene Versionen des gleichen Gens, sichtbar durch mehrere Banden. 3.) Der Primer bindet auch in einem anderen Abschnitt der DNA, sichtbar durch mehrere Banden.

### 3.2.7 real-time quantitative PCR

Unter dem Begriff der quantitativen real-time PCR (Anders *et al.*, 2001) (Xu & Miller, 2004) versteht man den Prozess, das Fortschreiten einer PCR nicht wie üblich (konventionelle PCR) anhand des Endproduktes zu messen, d.h. zu qualifizieren und zu quantifizieren, sondern während der Prozess noch andauert: in real time. Das Prinzip basiert darauf, dass im Reaktionsmix für die quantitative real-time PCR ein fluoreszierender Marker beigefügt ist, der mit der bei der PCR entstehenden doppelsträngigen DNA interkaliert. Hierbei nimmt die emittierte Fluoreszenz linear und streng in Abhängigkeit von der entstandenen Menge an doppelsträngiger DNA zu. Diese Fluoreszenz wird von dem die quantitative real-time PCR durchführenden Gerät gemessen. Je nach eingesetzter Menge an DNA wird somit ein manuell festgesetzter Schwellenwert an emittierter Fluoreszenz früher oder später überschritten (crossing point). Da diese Methode unspezifisch die Fluoreszenz in einer Probe misst (also nicht konkret das Endprodukt nachweist, wie es nach der konventionellen PCR im Agarose-Gel geschieht), kann im Gegensatz zur konventionellen PCR nur jeweils ein Gen pro Probe untersucht werden, jedoch können eine Vielzahl an Proben gleichzeitig untersucht werden. Über den Vergleich der Anzahl an Zyklen, die die PCR durchlaufen musste, bis für eine jeweilige Probe der Schwellenwert erreicht wurde, können somit Rückschlüsse über die eingesetzte Menge an DNA gemacht werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Quantifizierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA mittels quantitativer real-time PCR mit dem iQ™ SYBR® Green Supermix der Firma Bio-Rad, Martinsried auf

dem Bio-Rad iCycler iQ™ Real-Time Detection System durchgeführt. Maximal konnten 96 Proben gleichzeitig verarbeitet werden. 1 µl cDNA wurde gemäß Protokoll mit 7 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer sowie 10 µl iQ™SYBR® Green Supermix vermengt und gemäß des folgenden Amplifikationsprotokolles prozessiert: nach 2 Minuten auf 95°C folgten 35 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden. Anschließend wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikationsprodukte durchgeführt. Um Messungenauigkeiten zu verringern, wurden jeweils Triplets der cDNA-Proben gemessen. Als Kontrolle für die Reinheit des Reaktionsmixes sowie des Gerätes lief in jedem Ansatz einmal der iQ™SYBR® Green Supermix mit Primern, aber ohne cDNA (ersetzt durch H<sub>2</sub>O) sowie reines H<sub>2</sub>O mit.

### 3.2.8 Auswertung

Es existieren zwei grundsätzliche Methoden, die Ergebnisse einer real-time quantitativen PCR auszuwerten: zum einen können die erhaltenen Werte der Expression eines Zielgenes in Vergleich zu extern erstellten Kallibrierungskurven gesetzt werden (absolute Quantifizierung), wie es zum Beispiel in der Quantifizierung der Viruslast im Blut in der Diagnostik von HIV erfolgt. Zum anderen können die Expressionen des Zielgenes mittels Vergleich zu einem gleichzeitig gemessenen Referenzgen („housekeeping gene“) ermittelt werden (relative Quantifizierung). Letztere Methode fand in der Auswertung der aktuellen Studie Verwendung.

Um die mittels real-time quantitativer PCR erhaltenen Ergebnisse in der vorliegenden Studie auszuwerten, wurde auf das REST (Relative Expression Software Tool© (Pfaffl *et al.*, 2002) zurückgegriffen, das mithilfe des Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Tests© (Pfaffl, 2001) erlaubt, die Expression der eingesetzten Gene nach Normierung gegen ein ubiquitäres Referenzgen (hier verwendet: Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, GAPDH) miteinander zu vergleichen (Foss *et al.*, 1998; Marten *et al.*, 1994; Thellin *et al.*, 1999). Hierbei werden Aussagen getroffen, wie vielfach ein bestimmtes Gen in einer Probe im Vergleich zum gleichen Gen einer anderen Probe herauf- beziehungsweise herunterreguliert ist bei gleichzeitiger Angabe des Signifianzniveaus (p-Wert oder Fehler erster Art). Ebenfalls ableiten lässt sich, um wie viel ein bestimmtes Gen einer Probe im Vergleich zu anderen Genen derselben Probe herauf- oder herunterreguliert ist.

Die Formel von Pfaffl *et al.* lautet:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}} (\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}} (\text{control} - \text{sample})}}$$

Hierbei wird die Regulierung des Zielgens ( $R$ ) berechnet als Quotient der Expressionsraten ( $E$ ) von Zielgen ( $E_{\text{target}}$ ) zu Referenzgen ( $E_{\text{ref}}$ ).  $\Delta\text{CP}$  bezieht sich hierbei auf die Differenz ( $\Delta$ ) der crossing points (CP, siehe 3.2.7 real-time qualitative PCR) für die gemessenen Werte von Kontrollproben sowie Studienproben des Zielgens einerseits, und auf die Differenz der crossing points für die gemessenen Werte von Kontrollproben und Studienproben des Referenzgens andererseits.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überprüfung der Primer

Aufgrund der theoretischen Vorkenntnisse, die über Kollagene und deren Regulatoren im physiologischen Auf- und Abbau sowie in anderen Systemen der Fibrose, insbesondere TGF- $\beta$ , dessen Rezeptoren und den in dessen kaskadartigem intrazellulären Signaltransduktionssystem aufeinander folgenden Faktoren, des weiteren Faktoren, die aus den Gruppen der Myopathien, neuromuskulären Erkrankungen und systemischen wie lokalen Inflammationsprozessen bekannt sind, wurde folgende Auswahl an Genen getroffen, für die dann in einem ersten Schritt Primer nach der im Methodenteil beschriebenen Methode entwickelt wurden:  $\alpha$ -Actin, Acetylcholinrezeptor (nAChR $\alpha$ 1), die Kollagene 1, 3, 4 und 6, im Falle des Kollagens 1 (siehe Einleitung) beide Ketten (COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL6A1), Decorin, Fibroblast-Growth-Factor 1 und 2 sowie deren Rezeptor (FGF1, FGF2, FGFR1), TGF- $\beta$ , dessen Rezeptor (TGF $\beta$ R1), Faktoren seiner intrazellulären Signaltransduktion (c-Jun, c-Fos, SMAD2 und SMAD4), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase als ubiquitäres „house-keeping“ Gen (GAPDH), Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF1R), Interleukin 6 (IL6), Myosin heavy-chain Varianten (MHCslow, MHC2X), die Matrix-Metalloprotease 8 (MMP8), Myostatin, die Prolyl-4-Hydroxylase (P4H $\alpha$ 2), das Synapto-assoziierte Protein 25 (SNAP25) und das Strukturprotein Titin.

Aufgrund der Lage der Primer im jeweiligen Gen war die Länge des in der PCR zu replizierenden Abschnittes der bei der Umwandlung der aus den Muskelproben gewonnenen, die aktuelle Stoffwechsel-lage widerspiegelnden mRNA, in cDNA bekannt und wird in folgender Liste in Basenpaaren (bp) angegeben:

Tabelle 4: Primerliste

Produkt	Sequenz	Produktgröße (bp)
$\alpha$ -Actin	5' TGCCCATTTATGAGGGCTAC 3'	196
	3' GCCATCTCGTTCTCGAAGTC 5'	
nAChR $\alpha$ 1	5' TCCTGCTCTTTAGCCTTTGC 3'	234
	3' GGTTGTAATCCACCCATTGC 5'	
Col1A1	5' ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC 3'	172
	3' ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC 5'	
Col1A2	5' CTCCTGGTAATCCTGGAGCA 3'	161
	3' ACCAGCTCACCAACAAGTC 5'	

Col3A1	5' TCCTCCTGGAAAGAATGGTG 3'	245
	3' GTTCCCCAGGTTTTCCATTT 5'	
Col4A1	5' TGGTGACAAAGGACAAGCAG 3'	325
	3' GTTCACCTCTGATCCCCTGA 5'	
Col6A1	5' ACGAATGCGAGATTTTGGAC 3'	360
	3' GGTGTGGTGTCCCTCTGAGT 5'	
Decorin	5' TGGCAACAAAATCAGCAGAG 3'	274
	3' TTTGGTGTGTGTCCAGGTG 5'	
FGF1	5' CTGCCTCCAGGGAATTACAA 3'	128
	3' CATTGTTGTTGTGCTGGTC 5'	
FGF2	5' AGAGCGACCCTCACATCAAG 3'	234
	3' TCGTTTCAGTGCCACATACC 5'	
FGFR1	5' GAAGTTCAAATGCCCTTCCA 3'	260
	3' TCGATGTGCTTTAGCCACTG 5'	
c-Fos	5' AACTTCATTCCCACGGTCAC 3'	259
	3' CCCTTCGGATTCTCCTTTTC 5'	
GAPDH	5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'	185
	3' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 5'	
IGF1R	5' TGAGGATCAGCGAGAATGTG 3'	308
	3' CAGAGGCATACAGCACTCCA 5'	
IL6	5' CCACACAGACAGCCACTCAC 3'	220
	3' TTTTCACCAGGCAAGTCTCC 5'	
c-Jun	5' AGGAGGAGCCTCAGACAGTG 3'	253
	3' TGTTTAAGCTGTGCCACCTG 5'	
MHC2X	5' AAGAGCAGGGAGGTTACAC 3'	132
	3' TTATCTCCAAAAGTCATAAGTACA 5'	
MHCslow	5' CGGCTACAGGACCTGGTGGACA 3'	265

	3' ATTACAGGTTGGCAAGAGTGAG 5'	
MMP8	5' TCAAGCAACCCTATCCAACC 3'	435
	3' ACCTGGCTCCATGAATTGTC 5'	
Myostatin	5' GTGGATGGAAAACCCAAATG 3'	342
	3' TGGTCCTGGGAAGGTTACAG 5'	
P4Ha2	5' TCCAAAAGCTCCTGGCTAGA 3'	365
	3' GCAGCATGTCTTGTTCCGGTA 5'	
SMAD2	5' AGATCAGTGGGATACAACAGG 3'	264
	3' GGCATAATACTGGAGGCAA 5'	
SMAD4	5' TGTTTTGGGTGCATTACATTC 3'	229
	3' ATCAACAGTAACAATAGGGCAG 5'	
Snap25	5' CTGCTCGTGTAGTGGACGAA 3'	259
	3' AGCATCTTTGTTGCACGTTG 5'	
TGFβ1	5' CAGCAACAATTCCTGGCGATA 3'	135
	3' AAGGCGAAAGCCCTCAATTT 5'	
TGFβR	5' GATGGGCTCTGCTTTGTCTC 3'	254
	3' CACACTGGTCCAGCAATGAC 5'	
Titin	5' ATTGAAGCCCACTTTGATGC 3'	270
	3' GGAGATTCTTGCTGCTGGAG 5'	

Die Funktionalität der Primer wurde mittels Gel-Elektrophorese anhand des Vorhandenseins spezifischer Banden, die mittels normierter Markerbanden jeweils im gleichen Versuch direkt verglichen werden konnten, getestet.

Die einzelnen Primer mussten in gewissen Fällen aufgrund abweichender Ergebnisse der Elektrophorese neu kreiert und entsprechend neu getestet werden. In folgender Liste werden die einzelnen Primer Elektrophorese-Gelen zugeordnet, in denen sie mit definierter Bande und an erwarteter Stelle aufgetaucht waren. Die Photographien der Gele finden sich im Anhang (Anlage 1-8).

Tabelle 5: Experimente



Primer	Gel	Nummer	Produktgröße (bp)
$\alpha$ -Actin	1	1	196
nAChRa1	2	2	234
Col1A1	1	3	172
Col1A2	3	3 und 4	161
Col3A1	1	5	245
Col4A1	1	6	325
Col6A1	1	8	360
Decorin	1	17	274
FGF1	1	9	128
FGF2	5	1	234
FGFR1	1	10	260
c-Fos	1	19	259
GAPDH	1	2	185
IGF1R	1	11	308
IL6	1	12	220
c-Jun	1	18	253
MHC2X	5	3	132
MHCslow	5	4	265
MMP8	6	2	435
Myostatin	1	15	342
P4Ha2	5	6	365
SMAD2	1	20	264
SMAD4	1	21	229
Snap25	4	1	259
TGF $\beta$ 1	1	13	135
TGF $\beta$ R	1	14	254

Titin	7	9	270
-------	---	---	-----

## 4.2 Quantitative Expression

### 4.2.1 Ergebnisse gegenüber Kontrolle

#### 4.2.1.1 Signifikante Ergebnisse gegenüber Kontrolle

a) COL1A1 signifikant hochreguliert (21,7-fach,  $p=0,0035$ ),  $n=5$

b) COL3A1 signifikant hochreguliert (11,8-fach,  $p=0,001$ ),  $n=5$

c) TGF- $\beta$  signifikant hochreguliert (7,8-fach,  $p=0,005$ ),  $n=5$

d) Myostatin signifikant hochreguliert (7-fach,  $p=0,0225$ ),  $n=5$

e) Decorin signifikant hochreguliert (33,4-fach,  $p=0,001$ ),  $n=5$

f) Titin signifikant hochreguliert (14,6-fach,  $p=0,0155$ ),  $n=2$

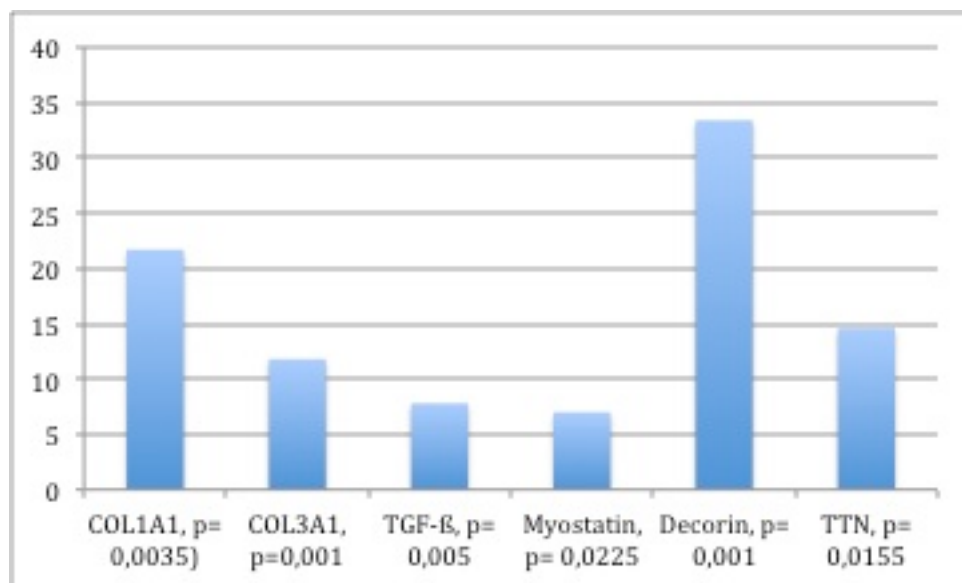


Abbildung 1: Signifikante Ergebnisse versus Kontrolle

#### 4.2.1.2 Nicht-signifikante Ergebnisse gegenüber Kontrolle

COL2A1, COL4A1, COL5A1, COL6A1, FGF1, IL-6, C-JUN, C-FOS, SMAD2, SMAD4, nAChR, FGFR, IGFR, Snap25 zeigten keine signifikant erhöhte Expression gegenüber Kontrolle.

## 4.2.2 Ergebnisse im Gruppenvergleich

### 4.2.2.1 Ergebnisse im Altersvergleich

COL1A1 in der Gruppe 6 Jahre und jünger, Botulinum-Toxin-negativ gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ signifikant hochreguliert (6-fach,  $p=0,0045$ )  $n=7$

### 4.2.2.2 Ergebnisse im Vergleich der motorischen Beeinträchtigung (GMFCS)

a) COL1A1 in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS I&II gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS III signifikant hochreguliert (3,2-fach  $p=0,001$ )  $n=12$

b) COL1A1 in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS IV&V gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS III signifikant hochreguliert (2,3-fach,  $p=0,05$ )  $n=12$

c) COL1A1 in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS I&II gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS IV&V nicht-signifikant hochreguliert (1,3-fach,  $p=0,4575$ )  $n=12$

### 4.2.2.3 Ergebnisse im Vergleich der BoNT-Behandelten gegenüber den BoNT-Nativen

a) COL1A1 in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-positiv gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ signifikant hochreguliert (12,8-fach,  $p=0,001$ )  $n=5$

b) COL1A1 in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-positiv, GMFCS IV&V gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS IV&V signifikant hochreguliert (10,4-fach,  $p=0,001$ )  $n=8$

c) TGF- $\beta$  in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-positiv, GMFCS IV&V gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS IV&V signifikant hochreguliert (6,8-fach,  $p=0,001$ )  $n=8$

d) TTN in der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-negativ, GMFCS IV&V gegenüber der Gruppe 9 Jahre und älter, Botulinum-Toxin-positiv, GMFCS IV&V signifikant hochreguliert (3,5-fach,  $p=0,001$ )  $n=5$

## 5 Diskussion

### 5.1 Probengewinnung

Verschiedene Aspekte bezüglich der Probengewinnung mussten in der Planung der Studie bedacht werden: Ein Grundproblem ist, dass die Einstufung der Patienten mittels GMFCS eben nur ein grobes Maß der Beeinträchtigung ist, in die viele Variablen einfließen, zentraler wie peripherer Natur: die Muskulatur kann fibrotisch und atroph sein, somit schlicht nicht mehr funktionabel. Des Weiteren kann die Parese oder aber die Spastizität (und diese auch noch beeinflussbar durch Botulinumtoxin) vorherrschen. Und es kann auch davon ausgegangen werden, dass Patienten mit schwerer CP auch durch ihre Komorbiditäten (in erster Linie die Intelligenzminderung, aber auch z. B. eine Epilepsie) außer Stande gesetzt werden, ihre Muskeln planmäßig zu steuern aufgrund fehlendem zentralen Inputs bei eventuell sogar noch operabler Muskulatur. Somit können sehr verschiedene Zustände in einem Körper herrschen, der schließlich in seinem groben Bewegungsumfang in einer einzigen Ziffer zusammengefasst wird. Licht in diese unterschiedlichen Zustände zu werfen war unter anderem Ziel der vorliegenden Studie. Ein Patientenkollektiv musste jedoch von vornherein aus der Studie ausgeschlossen werden: Patienten mit unilateraler CP unterscheiden sich oftmals deutlich von den mit bilateraler CP, auch hierzu gibt es in Analogie zu den oben genannten mehrere Hypothesen: die Patienten haben vermutlich eine weitgehend gesunde Gehirnhälfte und können somit aufgrund der Plastizität insbesondere des jungen Gehirns Teile des Ausfalls der anderen, betroffenen Gehirnhälfte kompensieren. Gleichzeitig können sie von schwerer Spastizität und/oder Parese betroffen sein, wie sich in der klinischen Untersuchung offenbart, und dennoch mit dem gesunden Bein für den Funktionsausfall des anderen kompensieren, so dass Patienten mit unilateraler CP meist nur GMFCS-Stadien I bis II zugeteilt werden. Da die vorliegende Studie jedoch die Untersuchung der Genexpression der Muskulatur von Patienten mit CP mit Hilfe molekularbiologischer Methoden beabsichtigte und dabei auch eine Korrelation zur motorischen Beeinträchtigung, ausgedrückt mittels GMFCS, geplant war, diese jedoch für Patienten mit unilateraler CP aufgrund genannter theoretischer Erwägungen bezweifelt werden musste, wurde dieses Patientenkollektiv von der Studie exkludiert.

Des Weiteren unterziehen sich Patienten mit CP charakteristischerweise bestimmten Operationen in bestimmten Lebensabschnitten, insbesondere wird mittlerweile sehr darauf Wert gelegt, dass nicht zu früh operiert wird. Gleichzeitig muss der Prozess der motorischen Reifung, die bis zum 6. Lebensjahr exponentiell voranschreitet, ausgenutzt werden, das heißt, das Individuum muss innerhalb der optimalen Lernzeit auch körperlich in die Situation versetzt werden, sich dem intellektuellen Niveau entsprechend zu bewegen. Auf nationaler wie internationaler Ebene herrscht inzwischen ein gewisser Konsensus, zu welcher Zeit welche Maßnahme erfolgen soll (Heinen *et al.*, 2009). Rein anatomisch bedingt sind die unteren Extremitäten immer betroffen bei Patienten mit CP, im Falle der BS-CP auch immer mindestens genauso schwer wie die obere Extremität. Somit lag es nahe, für die Studie vornehmlich die Muskulatur der unteren Extremität zu inkludieren. Zudem konnte die Zusammenarbeit mit einem kinderorthopädischen Zentrum erreicht werden, die fast ausschließlich die untere Extremität bei Kindern mit CP versorgt.

Nachdem die Spastizität die gegen die Schwerkraft arbeitenden Muskeln an der unteren Extremität schwerer betrifft und diese somit häufiger Ziel von Operationen sind, wurden diese als primäre Zielmuskeln angesehen. Im Einzelnen galt dies für die distale untere Extremität für den M. Triceps surae, also den M. Gastrocnemius und den M. Soleus, von denen Proben entnommen wurden, die doch für die vorliegende Studie nicht eingesetzt wurden. Für die proximale Muskulatur der unteren Extremität war vor allem die ischokrurale Muskelgruppe von Interesse, also der M. Semimembranosus, der M. Semitendinosus und der M. Biceps femoris, des Weiteren die medial gelegenen Adduktoren inklusive M. Gracilis und schließlich als Hüftbeuger der M. Iliopsoas im distalen, auf den Oberschenkel reichenden Teil. Die jeweils ventral gelegenen, mit der Schwerkraft arbeitenden Muskeln der unteren Extremität (M. Quadriceps femoris sowie die Tibialmuskulatur) sind nur in schwereren Fällen (GMFCS IV-V) Ziel von Operationen. In der Planung der vorliegenden Studie war es zunächst Ziel gewesen, Informationen über die Genexpression in unterschiedlichen Muskeln gesunder Kinder und Adoleszenter zu gewinnen und anschließend Muskelbiopsien aus primär gesunder Muskulatur, die aufgrund eines akuten Traumas einer Operation zugeführt wird, zu gewinnen. Leider konnten weder Literaturrecherche noch Kontakte mit angeschlossenen anatomisch-pathologischen Instituten auch nur annähernd eine Antwort darauf geben, wie die Genexpression von z.B. Kollagenen in gesunder Muskulatur von Kindern aussieht und noch weniger, ob sie sich zwischen funktionell unterschiedlichen Muskelgruppen unterscheidet. Unzweifelhaft ist, dass in Muskeln, die sich in der Anwendung (und histologisch) unterscheiden, auch eine veränderte Genexpression angenommen werden kann, bloß ist diese für Kinder und Jugendliche bisher nicht untersucht worden.

Ein weiteres Problem in der Studienplanung war die Beschaffung adäquater Kontrollbiopsien. Bisherige Studien, die sich mit der Histopathologie von Patienten mit CP befassen, haben entweder gar keine Kontrollen vorweisen können (Ito *et al.*, 1996; Marbini *et al.*, 2002) oder aber Kontrollen aus von den Proben stark abweichenden Altersgruppen (Booth *et al.*, 2001). Letztgenannte Gruppe hatte zwar Kontrollbiopsien aus der gleichen Muskelgruppe wie das Patientenkollektiv (M. Vastus lateralis), diese gehören jedoch der oftmals bei CP weniger schwer geschädigten ventralen Oberschenkelgruppe an. Das primäre Ziel der vorliegenden Studie, die gleiche Muskulatur von primär Muskelgesunden wie auch von Patienten mit CP zu erhalten, musste jedoch schon im Vorfeld als unrealistisch betrachtet werden, da sowohl im Kooperationszentrum der Studie (Zentrum für Kinder- und Neuroorthopädie der orthopädischen Klinik München-Harlaching, Leiter Dr. med. Bernius) als auch in der kinderchirurgischen Universitätsklinik der LMU München nur sehr selten Operationen durchgeführt wurden, bei denen die just bei Patienten mit CP betroffenen Muskeln der unteren Extremität eröffnet werden. Die operative Entnahme von Kontrollbiopsien an für die vorliegende Studie geeigneteren Muskeln hätte somit zusätzliche Eingriffe erfordert und sich daher ethisch nicht rechtfertigen lassen. Die ebenfalls diskutierte Möglichkeit, Biopsien aus der Muskulatur von Leichen akut verstorbener Kinder zu entnehmen, kam ebenfalls nicht in Frage, da die für die Studie interessante RNA nach dem Zelltod sehr rasch zersetzt wird. Aus diesem Grund wurde schließlich kommerziell erwerbliche RNA von menschlicher Skelettmuskulatur der Firma Zyagen (San Diego, CA, USA) als Kontrolle eingesetzt (Hager *et al.*, 2008).

## 5.2 Interpretation

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die Genexpression in der Muskulatur von Kindern mit CP auf mRNA-Ebene verändert ist. Es gibt überzeugende Evidenz dafür, dass veränderte Expression auf mRNA-Ebene in anderen Krankheiten, die mit erhöhter Kollagenablagerung (Fibrose) einhergehen, gut mit erhöhter Menge an fertigem Protein korreliert (Agocha *et al.*, 1997; Anders *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 1996; Sheehan & Allen, 1999). Zudem darf nicht vergessen werden, dass die Muskulatur von Kindern mit CP bereits in der körperlichen Untersuchung von passiver Extension nicht nur die für Spastizität typische, Geschwindigkeits-abhängige Tonuserhöhung zeigt, sondern – typischerweise nach mehreren Jahren, die die pathologischen Signale des ZNS Zeit hatten, auf die Muskulatur einzuwirken – sich eine Geschwindigkeits-unabhängige Tonuserhöhung zeigt, wie sie als typisch für die Fibrose gelten kann. Des Weiteren konnten Booth *et al.* eine Erhöhung des Netto-Kollagen-Gehaltes in der Muskulatur von Kindern mit CP nachweisen, so dass die vorliegende Studie die Reise von außen nach innen, das heißt von der der körperlichen Untersuchung zugänglichen Bewegungsstörung zu den makro- und mikropathologischen Veränderungen fortsetzt und auf mRNA-Ebene nachweist, dass die Fibrose in der Muskulatur von Kindern mit CP, die mit steigendem Alter die dynamische und besser medikamentös und interventionell (vor allem mit Botulinumtoxin) beeinflussbare Spastizität wenn nicht ablöst, so doch übertrifft in Signifikanz, auf Ablagerung von Kollagenen zurückzuführen ist, welche mit erhöhter Expression der korrelierenden mRNA beginnt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in sämtlichen durchgeführten Testläufen eine Erhöhung der Kollagen-1-Expression gegenüber Kontrolle, hochsignifikant und in ausgewählten Gruppen teilweise hundertfach erhöht. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden, die Einfluss auf die Expression haben können und das Ergebnis im Vergleich von Patienten versus Kontrolle potentiell verfälschen könnten: zum einen liegt die Vermutung nahe, dass die Muskulatur des Kindes generell einen höheren Stoffwechsel hat und somit auch mehr Kollagen exprimiert wird. Außerdem muss erhöhte Expression per se nicht mit erhöhter Ablagerung im Gewebe verbunden sein, sondern kann auch Ausdruck erhöhten Umsatzes (turnover) sein, wie er auch bei Sportlern zu sehen ist (Kjaer, 2004). Ein spezielles Problem liegt schließlich bei fibrotischen Erkrankungen und der Messung von Genaktivitäten über die mRNA vor: es könnten schlichtweg keine Zellen mehr vorhanden sein, die aktiven Stoffwechsel betreiben und somit ließen sich wenig Schlüsse ziehen aus Biopsien; dieses Problem versucht man z. B. in der diagnostischen Biopsieplanung von Muskelerkrankungen durch präoperative Ultraschalluntersuchungen mit dem Ziel, nicht-fibrotisches Gewebe zu finden, zu beheben.

In der vorliegenden Studie wurde RNA quantifiziert, ein generell schwieriges Unterfangen im Vergleich zu Messungen von Protein und DNA, die stabiler sind. Standardmethode zur Quantifizierung von RNA war bisher Northern Blotting: hierbei wurde direkt RNA gemessen mittels Gel-Elektrophorese, über die Lauflänge wurde die Ziel-RNA ermittelt und schließlich densitometrisch quantifiziert. Dies ist eine Methode mit sehr hohem statistischem Fehler, Abweichungen in der Größenordnung von 100% sind nicht

unüblich (Fernyhough, 2001). In der vorliegenden Studie hingegen wurde auf Quantifizierung mittels real-time quantitative PCR zurückgegriffen: hierbei wird zum einen vor der Untersuchung die RNA in stabilere cDNA umgeschrieben, die anschließend gemessen wird. Auch DNA wurde vor der Erfindung der PCR mittels Blotting gemessen, und zwar mittels Southern Blot, ebenfalls über Gel-Elektrophorese und anschließender photometrischer Densitometrie, mit gleichem statistischem Fehler wie beim Northern Blot. Selbst die PCR als die die Molekularbiologie revolutionierende Methode ist unschlagbar im Vergleich mit den alten Methoden, was den zeitlichen Aufwand betrifft, für absolute Quantifizierungen aber auch nicht optimal geeignet, da ein Endprodukt gemessen wird, die Reaktionsgeschwindigkeit aber nicht während der gesamten Zeit exponentiell ist und somit in einem messbaren Verhältnis zur Menge an DNA, die am Anfang eingesetzt wurde. Stattdessen interferieren die gebildeten Produkte mit der Reaktion, die dadurch ab einem ungewissen Moment gebremst wird. Man müsste also nach jedem Zyklus nachschauen, wie viel neue DNA sich gebildet hat, um nicht den Zeitpunkt zu verpassen, ab dem die Reaktionsgeschwindigkeit stagniert. Dies ist mit der klassischen PCR nicht möglich, wohl aber mit der real-time PCR, die genau dies durchführt: nach jedem Zyklus wird das von der neu gebildeten DNA emittierte Signal gemessen. Dieser Zuwachs an Messgenauigkeit macht die real-time PCR unschlagbar in der Quantifizierung von Nukleinsäuren.

Ein womöglich noch größerer Vorteil der real-time PCR gegenüber klassischen Methoden liegt nicht auf dem Gebiet der Messgenauigkeit, sondern auf dem des Vergleichs des gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Expression eines Gens mit einem Referenzgen. Bei der Quantifizierung von DNA ist dies nicht nötig, z. B. bei der Bestimmung der Viruslast im Blut eines Patienten: hierbei geht es um absolute Werte. Die Expression eines Gens in einer Biopsie hingegen hängt – wie oben angesprochen – ja zum einen vom Vorhandensein lebender Zellen im Biopsat ab (Thema Fibrose) und zum anderen von der Stoffwechsellage im Gewebe ab (Thema Vergleich Patienten-Biopsie mit kommerziell erworblicher RNA Erwachsener). Hierbei schlägt die real-time PCR quasi zwei Fliegen mit einer Klappe, indem sie die ermittelten Werte für die Expression eines Gens nicht absolut angibt, sondern in Relation setzt zu einem Referenzgen, das als ubiquitäres und von äußeren Stimuli unabhängiges Gen konstant exprimiert wird. Vereinfacht ausgedrückt so wird hiermit sichergestellt, dass die gemessenen Werte für die für die vorliegende Studie interessanten Gene nicht in inaktivem Gewebe gemessen und somit verfälscht werden.

Das Problem der Differenzierung zwischen erhöhter Kollagenexpression mit nachfolgender pathologischer Ablagerung und physiologischer Expression als Ausdruck des Stoffwechsels (turnover) konnte in der vorliegenden Studie nicht befriedigend gelöst werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass bei physiologischer Remodellierung des Gewebes auch die das Kollagen abbauenden Matrixmetalloproteasen erhöht exprimiert sind. Dies experimentell nachzuweisen ist zukünftiger Forschung vorbehalten.

Aus den Versuchen, die Patientenproben mit der Kontrolle verglichen haben, konnten letztlich erwartbare Schlüsse gezogen werden: die Genexpression in der Muskulatur von Patienten mit CP ist verändert. In erster Linie wurde ja das Kollagen 1, gemäß seiner vorherrschenden Rolle im Muskel getestet

und zeigte sich wie erwartet erhöht exprimiert, ebenso wie sein aus anderen fibrotischen Erkrankungen bekannter Stimulator TGF- $\beta$ . Während TGF- $\beta$  als Transkriptionsfaktor in die Regulierung des Kollagens auf mRNA-Ebene eingreift, ist Decorin in dessen extrazelluläre Prozessierung involviert. Folgerichtig lässt sich dessen erhöhte Expression als weiteres Indiz dafür werten, dass nicht nur die in der vorliegenden Studie gemessene Menge an mRNA von Kollagen erhöht ist, sondern auch die des fertigen Proteins. Dies war bereits von Booth et al. auf Proteinebene gezeigt worden (Booth *et al.*, 2001). Erhöhte Myostatin-Expression ist mit Muskelatrophie vergesellschaftet und somit ist die in unseren Versuchen bestätigte erhöhte Expression keine Überraschung und spiegelt auf molekularer Ebene den makroskopisch beobachtbaren Muskelverlust von Patienten mit CP. Die in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden involvierten Moleküle (c-Jun, c-Fos, SMAD2, SMAD4) zeigten wie auch andere Wachstumsfaktoren (FGF1), deren Rezeptoren (FGFR1, IGFR1) und das in der Reizweiterleitung (und deren Blockierung durch Botulinumtoxin) inkorporierte SNAP25 sowie Cytokine (IL-6, IL-2) keine veränderte Expression auf mRNA-Ebene, was allerdings eine veränderte Aktivität dieser Faktoren nicht ausschließt, da diese oftmals von post-translationellen Veränderungen wie Phosphorylierungen abhängen und somit den in der vorliegenden Studie verwendeten Untersuchungsmethoden nicht zugänglich waren.

Die aus den Studien im Vergleich zur Kontrolle gewonnen Erkenntnisse stehen mit Sicherheit im Schatten jener Ergebnisse, die durch Gruppenvergleich gewonnen werden konnten. Ein großer Vorteil dieser Untersuchungen liegt schon begründet in der Tatsache, dass diese Ergebnisse ohne Vergleich zur Kontrolle stehen – was sämtliche negativen Aspekte, die im Vergleich mit Kontrollmaterial im Allgemeinen und in dieser Studie im Besonderen immer vorhanden sind, ausschließt. Möglich wurde dieser Gruppenvergleich durch den Ausschluss von ungeeigneten Patienten (z.B. falsche Ätiologie einer klinisch diagnostizierten Cerebralparese, oder aber unilaterale CP, siehe Einleitung), genaue klinische Einteilung der inkludierten Patienten mittels GMFCS, Alter und Botulinumtoxin-Behandlung sowie vor allem die Homogenität des Probenmaterials: für die gewonnen Ergebnisse der Gruppenvergleiche wurden ausschließlich Proben aus der ischiokruralen Muskulatur verarbeitet. Somit wurde eine unseres Wissens einzigartige Probenbank geschaffen, die es ermöglichte, Untergruppen zu bilden und zu untersuchen, die sich einzig in Bezug auf eines der drei möglichen Kriterien Alter, Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung sowie Behandlung mit Botulinumtoxin unterscheiden. Die Gruppeneinteilungen sahen dabei wie folgt aus: die eine Altersgruppe beinhaltete Patienten im Alter von 9 Jahren oder älter, die andere Gruppe die im Alter von 7 Jahren oder jünger. Zudem wurden die leicht motorisch Beeinträchtigten von den moderat sowie von den schwer motorisch Beeinträchtigten und die mit Botulinumtoxin behandelten Patienten von den nicht behandelten unterschieden.

Folgerichtig wiesen die aus den Gruppenvergleichen gewonnenen Ergebnisse nicht länger die um manchmal mehrere tausend Prozent verschiedenen Unterschiede auf, sondern waren vielfach nicht signifikant voneinander unterschieden, was sicher der Homogenität des Materials geschuldet war. Umso interessanter sind schließlich die, teilweise ebenfalls sehr deutlichen und signifikanten Ergebnisse, die gewonnen wurden, und die äußerst überraschend sind in Bezug auf die Behandlung mit Botulinumtoxin.



Zunächst einmal zeigte sich, dass Kollagen 1 bei nicht mit Botulinumtoxin behandelten Patienten in der jüngeren Altersgruppe höher exprimiert ist als in der älteren. Dieses Ergebnis, das zunächst gemischt für alle Schweregrade motorischer Beeinträchtigung getestet wurde, wurde schließlich bestätigt in der Untergruppe der schwer motorisch Beeinträchtigten. Diese Resultate mögen zunächst erstaunen, erwartet man doch mit zunehmenden Alter und zunehmender Fibrose auch mehr Kollagengehalt. Der erhöhte Kollagengehalt ist ja auch mit Sicherheit enthalten und durch die Methode der real-time PCR mit Referenzgenen wurde ausgeschlossen, dass die erhobenen Werte aus Gewebe mit reduziertem turn-over stammt beziehungsweise wurden die Werte je nach basalem Stoffwechsel korrigiert. Somit bleibt zu spekulieren, dass es sich in der erhöhten Kollagenexpression bei den jüngeren Kindern um ein Zeichen für erhöhte Aktivität handelt, die nicht zwangsläufig in der erhöhten, pathologischen Ablagerung von Kollagen enden muss, sondern auch Ausdruck eines erhöhten Umsatzes sein kann.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Schweregrade motorischer Beeinträchtigung zeigte sich zunächst einmal kein signifikanter Unterschied zwischen den schwer und leicht motorisch Beeinträchtigten in der Kollagenexpression. Interessanterweise waren aber sowohl bei den leicht als auch bei den schwer motorisch Beeinträchtigten Kollagen 1 signifikant höher exprimiert als bei den moderat motorisch Beeinträchtigten. Dieses Ergebnis lässt sich auch im Sinne der vorigen Ergebnisse im Altersvergleich interpretieren: Es erscheint möglich, dass die weniger schwer Beeinträchtigten als Ausdruck ihres besseren Bewegungsumfanges (wie eben auch die jüngeren gegenüber den Älteren) einen höheren Grundumsatz an Kollagen 1 haben, während die schwerer Beeinträchtigten im gleichen Alter eine erhöhte Expression als Zeichen pathologischer Ablagerung haben. Diese Ergebnisse müssen noch bestätigt werden, waren jedoch signifikant und reproduzierbar. Umso wichtiger erscheint es, ein Molekül zu finden und untersuchen zu können, das pathologische Kollagenablagerung von physiologischer im Sinne von erhöhtem Durchsatz unterscheidet. Ein möglicher Kandidat ist Titin, wie im Folgenden erläutert wird.

Im Vergleich zu den älteren, die ähnlich erhöhte Expressionsmuster von Kollagen sowohl bei den leicht als bei den schwer motorisch Beeinträchtigten gegenüber den moderat motorisch Beeinträchtigten aufwiesen, konnte bei den jüngeren, nicht mit Botulinumtoxin Behandelten eine signifikante Erhöhung des Kollagens in der Gruppe der moderat motorisch Beeinträchtigten gegenüber den leicht motorisch Beeinträchtigten gefunden werden, die weiteren Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant. In diesem Test wurde auch Titin untersucht und es zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie Kollagen: auch Titin war signifikant erhöht exprimiert in der Gruppe der jüngeren, nicht Botulinumtoxin-Behandelten mit moderater motorischer Beeinträchtigung gegenüber denen mit leichter motorischer Beeinträchtigung.

Die am Meisten überraschenden und gleichzeitig konsistentesten Ergebnisse wurden gewonnen in den Vergleichen zwischen Patienten, die mit Botulinumtoxin behandelt worden waren und denen, die keine solche Behandlung erfahren hatten: Zunächst zeigte sich die Expression von Kollagen signifikant erhöht in der älteren, mit Botulinumtoxin behandelten Gruppe gegenüber den nicht behandelten

(ohne Rücksicht auf den Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung zu nehmen). In einem erneuten Versuch wurden ausschließlich die Proben älterer, schwer motorisch Beeinträchtigter verglichen, und abermals waren die mit Botulinumtoxin behandelten signifikant erhöht in der Kollagenexpression gegenüber den nicht behandelten. Dieses Ergebnis konnte, ebenfalls signifikant, auch für TGF- $\beta$  bestätigt werden. In einem letzten Versuch im Vergleich der älteren Gruppe mit schwerer motorischer Beeinträchtigung wurde erneut eine signifikant erhöhte Expression von Kollagen gemessen bei den mit Botulinumtoxin behandelten gegenüber den nicht behandelten Patienten. Und in diesem Versuch wurde schließlich auch Titin getestet, welches ein deutlich abweichendes Expressionsmuster zeigte: Titin war signifikant erhöht exprimiert in der Gruppe der nicht mit Botulinumtoxin behandelten gegenüber den behandelten Patienten.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es Expressionsmuster von Kollagen 1, TGF- $\beta$  und Titin im Gruppenvergleich gibt, die teilweise den Hypothesen widersprechen und anhand der klinischen Erfahrung in der Behandlung von Patienten mit CP unbedingt bestätigt werden müssen. Am Wichtigsten erscheint hierbei die Suche nach einem Marker, der eine erhöhte Kollagenexpression zu unterscheiden hilft in eine pathologische und eine physiologische. TGF- $\beta$  scheint hierbei nicht geeignet zu sein, es hat sich in sämtlichen Versuchen als weitgehend mit Kollagen 1 korrelierend gezeigt. Titin dagegen folgt zumindest in der älteren Gruppe mit schwerer motorischer Beeinträchtigung nicht dem Expressionsmuster des Kollagens, während es dies in der jüngeren Gruppe tut.

Gerade im Zuge aktueller Studien, die zeigen konnten, dass sich Botulinumtoxin deutlich länger im humanen Muskel nachweisen lässt als von Tierversuchen erwartet sowie von Studien, die den Langzeiteffekt von Botulinumtoxin untersuchen und infrage stellen, stellt sich die Frage, ob die Biologie des Botulinumtoxins gut genug verstanden ist (Ryll *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2009; Tedroff *et al.*, 2009; Tedroff *et al.*, 2010). Nicht vergessen werden sollte im Vergleich der Studienpopulationen vor und nach Einführung von Botulinumtoxin den frühen 1990er Jahren, dass es gleichzeitig große Fortschritte auch in den klassischen therapeutischen Feldern (wie Physiotherapie) und durch die sich immer weiter verbreitende Anwendung der PEG-Sonde gibt, die ein besseres funktionelles Outcome miterklären können.

Wie bereits unter 2.2.1, Spastizität, angesprochen, lässt sich spekulieren, ob die Spastizität und damit auch die gegenüber Normen pathologische Haltung und Bewegung von Menschen mit CP immer nur zum Nachteil sein müssen, oder ob nicht vielmehr als Folge des Verlustes zentraler Kontrolle auf die evolutionär ältere, von monosynaptischen Rückenmarksreflexen bestimmte Kontrolle, die die Spastizität (ganz im Gegenteil zur schlaffen Lähmung) ausübt, zurückgegriffen wird. Und die Frage hierbei ist, ob dies nur zum Nachteil des Patienten ist, oder ob nicht vielmehr die Indikation zur Schwächung der Spastizität (die in extremer Ausprägung mit Hüftluxationen und Schmerzen sicher einen Nachteil für den Patienten darstellt) selbst in Zeiten, in denen uns mit Botulinumtoxin ein wirksames Instrument zur Seite steht, kritisch gestellt werden muss. Und es muss die Frage gestellt werden, was eigentlich normale Haltung und Bewegung in der ja vom Normalen per definitionem, per Diagnose verschiedenen

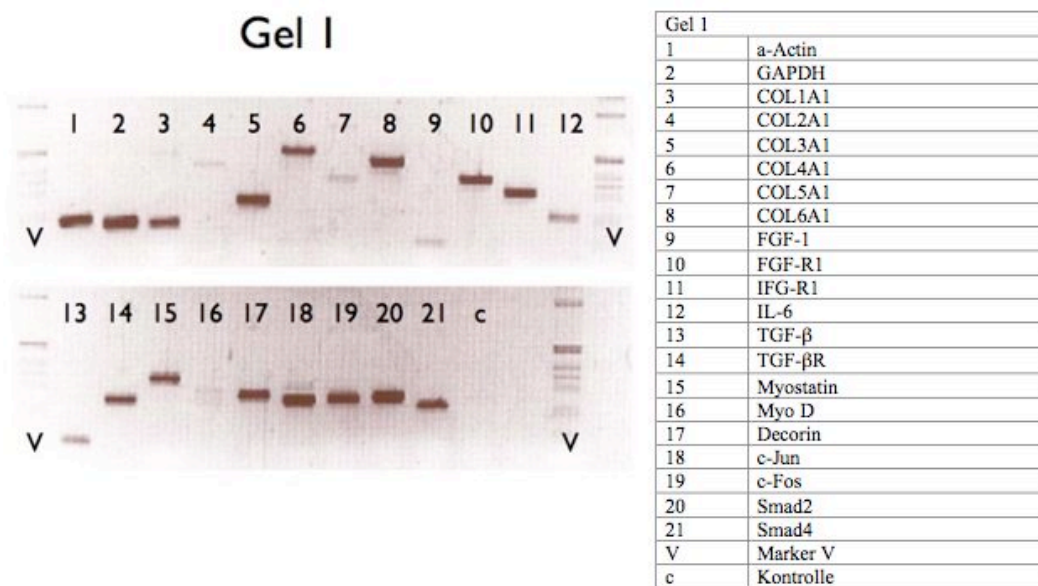
Population der Menschen mit CP ist – eine Frage, die bereits in anderen Zusammenhängen gestellt wurde („What are ‚normal movements‘ in atypical populations?“) (Latash & Anson, 1996).

Abschließend lässt sich in Bezug auf die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zusammenfassen:

- 1.) Es konnte bestätigt werden, dass die Akkumulation von Kollagenen in der Muskulatur von Patienten mit CP einher geht mit einer erhöhten Expression der Kollagene auf mRNA-Ebene.
- 2.) Mit TGF- $\beta$  und Decorin und vermutlich auch IL-6 waren zumindest einige der Regulatoren der Kollagenbiosynthese in ihrer Expression signifikant erhöht.
- 3.) Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Kollagen 1 altersabhängig geschieht.
- 4.) Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Kollagen 1 sich je nach Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung, gemessen mittels GMFCS, unterscheidet.
- 5.) Die Behandlung des Muskels mit Botulinumtoxin hat signifikanten Einfluss auf die Expression von Kollagen 1.

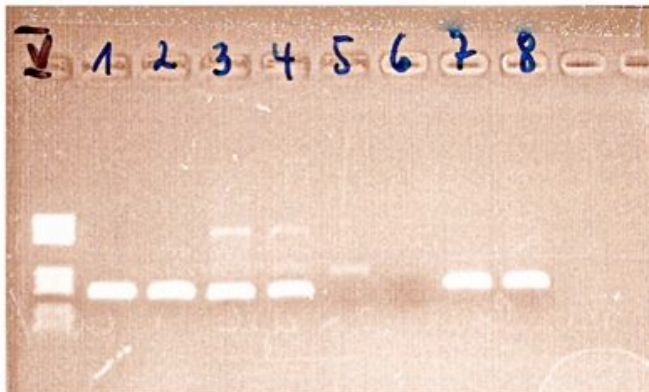
## 6 Anhang

Anlage 1:



Anlage 2:

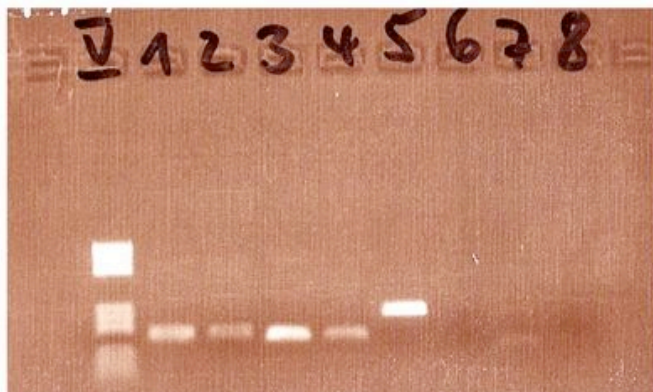
Gel 2



Gel 2	
1	GAPDH
2	GAPDH
3	COL1A1
4	COL1A1
5	nAchR
6	nAchR
7	aActin
8	aActin
V	Marker V

Anlage 3:

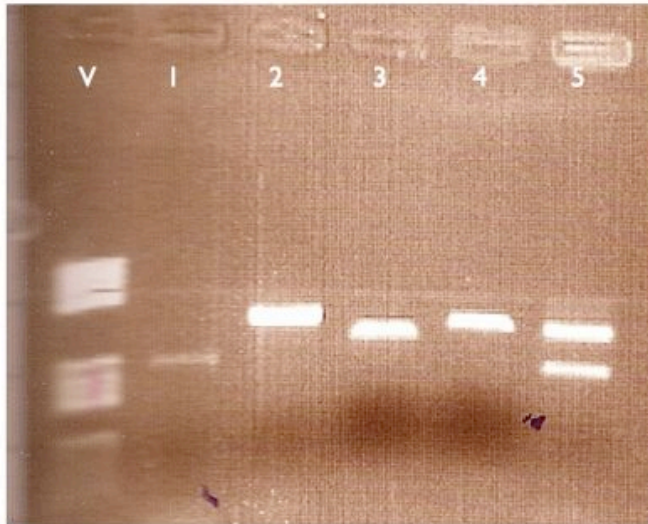
Gel 3



Gel 3	
1	COL1A1
2	COL1A1
3	COL1A2
4	COL1A2
5	COL3A1
6	COL3A1
7	TGF- $\beta$
8	TGF- $\beta$
V	Marker V

Anlage 4:

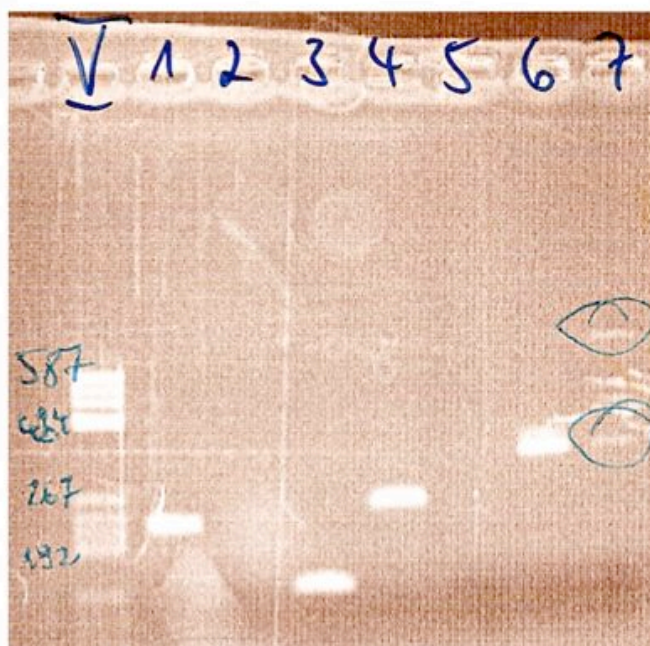
## Gel 4



Gel 4	
1	SNAP 25
2	FGFR1
3	IGFR1
4	Myostatin
5	IL15R
V	Marker V

Anlage 5:

Gel 5

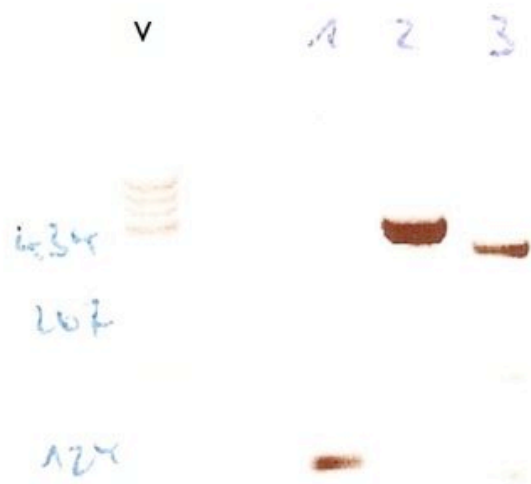


Gel 5	
1	FGF2
2	MMP8
3	MHC2X
4	MHCslow
5	MMP1
6	P4H
7	IL1B
V	Marker V



Anlage 6:

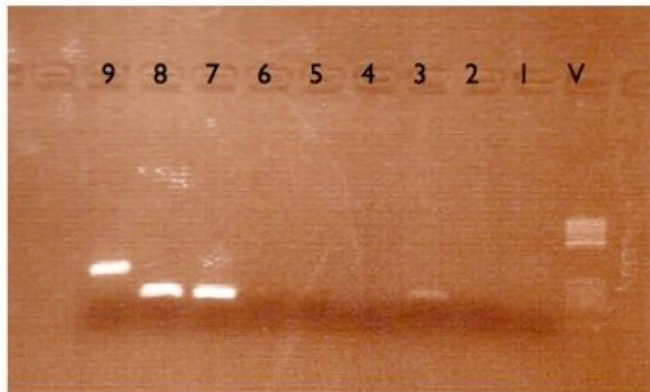
## Gel 6



Gel 6	
1	MMP1
2	MMP8
3	IL1B
V	Marker V

Anlage 7:

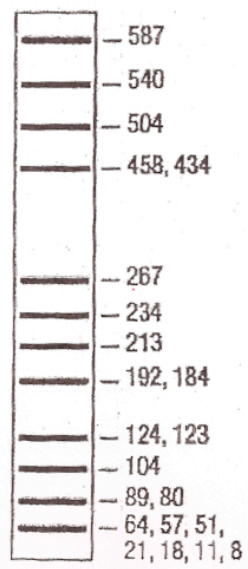
## Gel 7



Gel 7	
1	RNA
2	RNA
3	RNA
4	RNA
5	RNA
6	RNA
7	GAPDH
8	GAPDH
9	TTN
V	Marker V

Anlage 8:

## Marker V



## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Florian Heinen danke ich für die Aufnahme ins Team und damit die Möglichkeit, die Promotion durchzuführen; des Weiteren für Motivation, Vor- und Leitbildsfunktion und Freundschaft.

Herrn PD Dr. Ingo Borggräfe danke ich für das Promotionsthema, die Einführung in die forschende Wissenschaft und unermüdliche Betreuung während vieler Jahre.

Frau Prof. Dr. Ania Muntau danke ich für die Bereitschaft, uns in den Forschungsräumen des Kubus der Dr. von Haunerschen Kinderklinik forschen zu lassen inklusive Mitbenutzung sämtlicher Geräte.

Frau Susanne Wullinger danke ich für viele praktische Tipps in der Laborarbeit.

Herrn Dr. Peter Bernius und Dr. Michael Poschmann danke ich für große Hilfe in der Probenentnahme während orthopädischer Operationen.

Den Kindern und Eltern, die so bereitwillig an der Studie teilnahmen, danke ich von ganzem Herzen.

Meiner Familie danke ich für Ausharren, Ermutigen und Verständnis.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliches**

Nachname	Böhmer
Vorname	Jens
Geburtsdatum	05.01.1981
Geburtsort	Offenbach am Main
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Unverheiratet
Adresse	Föreningsvägen 14, 433 64 Sävedalen, Schweden
Email:	jens.boehmer@med.uni-muenchen.de

### **Schul Ausbildung**

1988 – 1991	Grundschule Diesterwegschule, Frankfurt am Main
1991 – 2000	Lessing-Gymnasium Frankfurt am Main, Abschluss: Abitur

### **Zivildienst**

2000 – 2001	Heilpädagogische Tagesstätte Riemerling, Ottobrunn
-------------	--

## Studium der Humanmedizin

2001 - 2008                      Ludwig-Maximilians-Universität München

## Prüfungen

2003                              Ärztliche Vorprüfung

2008                              2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Beruflicher Werdegang

Seit 2008                      Assistenzarzt des Queen Silvia Children's Hospital, Sahlgrenska University, Göteborg, Schweden

## Publikationen

Boehmer J, Sjoestroem A, Hedstroem A, Steneryd K, Darin N *Status epilepticus amauroticus congenitus in a 14-month old boy?*

Eur J Paediatr Neurol. 13, Suppl 1: P190 2009 (Poster)

Boehmer J, Käppi T, Elversson J, Olsson I *Kopfschmerzen und Husten mit 2 Jahren – kein alltäglicher Fall*

Monatsschr Kinderheilkd., 157, Suppl 1:PO226 2009 (Poster)

Böhmer J, Noterdaeme M. *Störungen des autistischen Spektrums,*

Böhmer J, Borggräfe I, Heinen F. *Andere Epilepsiesyndrome,*

Böhmer J, Rost I. *Trisomie 21,*

Böhmer J, Krieg S, Christen H-J. *Neurodegenerative Erkrankungen*,

Böhmer J, Krieg S. *Chiari-Malformationen*,

Böhmer J, Krieg S, Heinen F. *Neurologische Untersuchung*,

Böhmer J, Heinen F. *Lumbalpunktion*,

Heinen F, Böhmer J, Straube A. *Migräne*,

Heinen F, Böhmer J, Hufschmidt A. *Pseudotumor cerebri*,

Stehr M, Böhmer J. *Blasenfunktionsstörung*,

sämtliche aus:

Heinen F, Böhmer J, Hufschmidt A, Berweck S, Christen H-J, Fietzek U, Kieslich M, Krieg S, Mall V, Müller-Felber W (eds) (2009): *Pädiatrische Neurologie. Paediatric Clinical Scouts für Diagnose und Therapie*. Stuttgart: Kohlhammer

Borggraefe I, Boetzel K, Boehmer J et al. *Return to participation - significant improvement after bilateral pallidal stimulation in rapidly progressive DYT-1 dystonia*.

Neuropediatrics. 2008; 39(4):239-42.

Borggraefe I, Boehmer J, et al. *Elevated expression of collagen I and III and their regulators in the muscle of patients with cerebral palsy (CP)*.

Europ J Pediatr Neurol 2005; 9 (3/4): 267 (Abstract)

Borggraefe I, Boehmer J, et al. *Expression of procollagen I, III und IV and their regulators in muscles of children with Cerebral Palsy (CP)*.

Neuropediatrics 2005; 36: 163 (Abstract)

## 7 Literaturverzeichnis

- Ade-Hall RA & Moore AP. (2000) Botulinum toxin type A in the treatment of lower limb spasticity in cerebral palsy. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* (2): CD001408.
- Agocha A, Sigel AV & Eghbali-Webb M. (1997) Characterization of adult human heart fibroblasts in culture: a comparative study of growth, proliferation and collagen production in human and rabbit cardiac fibroblasts and their response to transforming growth factor-beta1. *Cell and tissue research* **288**(1): 87-93.
- Albrecht DE & Tidball JG. (1997) Platelet-derived growth factor-stimulated secretion of basement membrane proteins by skeletal muscle occurs by tyrosine kinase-dependent and -independent pathways. *The Journal of biological chemistry* **272**(4): 2236-44.
- Albright AL, Cervi A & Singletary J. (1991) Intrathecal baclofen for spasticity in cerebral palsy. *Jama* **265**(11): 1418-22.
- Almekinders LC & Temple JD. (1998) Etiology, diagnosis, and treatment of tendonitis: an analysis of the literature. *Medicine and science in sports and exercise* **30**(8): 1183-90.
- Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ & Schlondorff D. (2002) A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *The Journal of clinical investigation* **109**(2): 251-9.
- Anders HJ, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Segerer S, Luckow B, Weller L, Grone HJ & Schlondorff D. (2001) Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **12**(5): 919-31.
- Ashwal S, Russman BS, Blasco PA, Miller G, Sandler A, Shevell M & Stevenson R. (2004) Practice parameter: diagnostic assessment of the child with cerebral palsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* **62**(6): 851-63.
- Autti-Ramo I, Suoranta J, Anttila H, Malmivaara A & Makela M. (2006) Effectiveness of upper and lower limb casting and orthoses in children with cerebral palsy: an overview of review articles. *Am J Phys Med Rehabil* **85**(1): 89-103.
- Bailey AJ, Shellswell GB & Duance VC. (1979) Identification and change of collagen types in differentiating myoblasts and developing chick muscle. *Nature* **278**(5699): 67-9.
- Banes AJ, Horesovsky G, Larson C, Tsuzaki M, Judex S, Archambault J, Zernicke R, Herzog W, Kelley S & Miller L. (1999) Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **7**(1): 141-53.
- Bax M. (2001) Does 'therapy' have a future? *Developmental medicine and child neurology* **43**(1): 3.
- Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, Jacobsson B & Damiano D. (2005) Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Developmental medicine and child neurology* **47**(8): 571-6.
- Beckung E & Hagberg G. (2002) Neuroimpairments, activity limitations, and participation restrictions in children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **44**(5): 309-16.
- Berger W, Horstmann G & Dietz V. (1984) Tension development and muscle activation in the leg during gait in spastic hemiparesis: independence of muscle hypertonia and exaggerated stretch reflexes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **47**(9): 1029-33.
- Berweck S, Schroeder AS, Fietzek UM & Heinen F. (2004) Sonography-guided injection of botulinum toxin in children with cerebral palsy. *Lancet* **363**(9404): 249-50.
- Bidder M, Towler DA, Gelberman RH & Boyer MI. (2000) Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *J Orthop Res* **18**(2): 247-52.
- Blundell SW, Shepherd RB, Dean CM, Adams RD & Cahill BM. (2003) Functional strength training in cerebral palsy: a pilot study of a group circuit training class for children aged 4-8 years. *Clin Rehabil* **17**(1): 48-57.



- Bohannon RW & Smith MB. (1987) Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Physical therapy* **67**(2): 206-7.
- Booth CM, Cortina-Borja MJ & Theologis TN. (2001) Collagen accumulation in muscles of children with cerebral palsy and correlation with severity of spasticity. *Developmental medicine and child neurology* **43**(5): 314-20.
- Booth FW & Kelso JR. (1973) Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflugers Arch* **342**(3): 231-8.
- Bornstein P & Sage H. (1989) Regulation of collagen gene expression. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **37**: 67-106.
- Boyce WF, Gowland C, Rosenbaum PL, Lane M, Plews N, Goldsmith CH, Russell DJ, Wright V, Potter S & Harding D. (1995) The Gross Motor Performance Measure: validity and responsiveness of a measure of quality of movement. *Physical therapy* **75**(7): 603-13.
- Brin IL, Kurenkov AL & Gotlib V. (1999) [The use of sirdalud in cerebral palsy in children]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* **99**(10): 30-3.
- Buller AJ & Lewis DM. (1965) Some Observations on the Effects of Tenotomy in the Rabbit. *The Journal of physiology* **178**: 326-42.
- Butler C & Darrah J. (2001) Effects of neurodevelopmental treatment (NDT) for cerebral palsy: an AACPD evidence report. *Developmental medicine and child neurology* **43**(11): 778-90.
- Butt RP & Bishop JE. (1997) Mechanical load enhances the stimulatory effect of serum growth factors on cardiac fibroblast procollagen synthesis. *Journal of molecular and cellular cardiology* **29**(4): 1141-51.
- Campbell WM, Ferrel A, McLaughlin JF, Grant GA, Loeser JD, Graubert C & Bjornson K. (2002) Long-term safety and efficacy of continuous intrathecal baclofen. *Developmental medicine and child neurology* **44**(10): 660-5.
- Canty EG & Kadler KE. (2002) Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comparative biochemistry and physiology* **133**(4): 979-85.
- Carnac G, Ricaud S, Vernus B & Bonniieu A. (2006) Myostatin: biology and clinical relevance. *Mini reviews in medicinal chemistry* **6**(7): 765-70.
- Castle ME, Reyman TA & Schneider M. (1979) Pathology of spastic muscle in cerebral palsy. *Clinical orthopaedics and related research* (142): 223-32.
- Chiarello LA, O'Neil M, Dichter CG, Westcott SL, Orlin M, Marchese VG, Tieman B & Rose RU. (2005) Exploring physical therapy clinical decision making for children with spastic diplegia: survey of pediatric practice. *Pediatr Phys Ther* **17**(1): 46-54.
- Chicoine MR, Park TS & Kaufman BA. (1997) Selective dorsal rhizotomy and rates of orthopedic surgery in children with spastic cerebral palsy. *Journal of neurosurgery* **86**(1): 34-9.
- Chiquet M, Renedo AS, Huber F & Fluck M. (2003) How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* **22**(1): 73-80.
- Christine C, Dolk H, Platt MJ, Colver A, Prasauskiene A & Krageloh-Mann I. (2007) Recommendations from the SCPE collaborative group for defining and classifying cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol Suppl* **109**: 35-8.
- Chu ML, de Wet W, Bernard M, Ding JF, Morabito M, Myers J, Williams C & Ramirez F. (1984) Human pro alpha 1(I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. *Nature* **310**(5975): 337-40.
- Chung WH, Bennett BM, Racz WJ, Brien JF & Massey TE. (2001) Induction of c-jun and TGF-beta 1 in Fischer 344 rats during amiodarone-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(5): L1180-8.
- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV & Weber KT. (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* **27**(6): 1281-92.
- D'Souza D & Patel K. (1999) Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. *Anatomy and embryology* **200**(4): 367-75.
- Danielsen CC, Wiggers H & Andersen HR. (1998) Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**(7): 1431-42.

- Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, Kalhan SC & McCullough AJ. (2004) Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(6): G1124-30.
- Dietz V. (1999) Supraspinal pathways and the development of muscle-tone dysregulation. *Developmental medicine and child neurology* **41**(10): 708-15.
- Dietz V. (2003) Spinal cord pattern generators for locomotion. *Clin Neurophysiol* **114**(8): 1379-89.
- Dietz V & Berger W. (1995) Cerebral palsy and muscle transformation. *Developmental medicine and child neurology* **37**(2): 180-4.
- Dietz V, Ketelsen UP, Berger W & Quintern J. (1986) Motor unit involvement in spastic paresis. Relationship between leg muscle activation and histochemistry. *Journal of the neurological sciences* **75**(1): 89-103.
- Dietz V, Trippel M & Berger W. (1991) Reflex activity and muscle tone during elbow movements in patients with spastic paresis. *Annals of neurology* **30**(6): 767-79.
- Eisenberg BR & Salmons S. (1981) The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. *Cell and tissue research* **220**(3): 449-71.
- Eliasson AC, Krumlinde-Sundholm L, Rosblad B, Beckung E, Arner M, Ohrvall AM & Rosenbaum P. (2006) The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Developmental medicine and child neurology* **48**(7): 549-54.
- Engsberg JR, Ross SA, Collins DR & Park TS. (2006) Effect of selective dorsal rhizotomy in the treatment of children with cerebral palsy. *Journal of neurosurgery* **105**(1 Suppl): 8-15.
- Fernyhough P. (2001) Quantification of mRNA levels using northern blotting. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **169**: 53-63.
- Fluck M, Carson JA, Gordon SE, Ziemiecki A & Booth FW. (1999) Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle. *The American journal of physiology* **277**(1 Pt 1): C152-62.
- Foran JR, Steinman S, Barash I, Chambers HG & Lieber RL. (2005) Structural and mechanical alterations in spastic skeletal muscle. *Developmental medicine and child neurology* **47**(10): 713-7.
- Foss DL, Baarsch MJ & Murtaugh MP. (1998) Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal biotechnology* **9**(1): 67-78.
- Fraser RD, MacRae TP & Suzuki E. (1979) Chain conformation in the collagen molecule. *Journal of molecular biology* **129**(3): 463-81.
- Garfin SR, Tipton CM, Mubarak SJ, Woo SL, Hargens AR & Akeson WH. (1981) Role of fascia in maintenance of muscle tension and pressure. *J Appl Physiol* **51**(2): 317-20.
- Gauthier D & Ven Murthy MR. (1987) Efficacy of RNase inhibitors during brain polysome isolation. *Neurochem Res* **12**(4): 335-9.
- Gilmartin R, Bruce D, Storrs BB, Abbott R, Krach L, Ward J, Bloom K, Brooks WH, Johnson DL, Madsen JR, McLaughlin JF & Nadell J. (2000) Intrathecal baclofen for management of spastic cerebral palsy: multicenter trial. *Journal of child neurology* **15**(2): 71-7.
- Goldberg H, Helaakoski T, Garrett LA, Karsenty G, Pellegrino A, Lozano G, Maity S & de Crombrughe B. (1992) Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells. *The Journal of biological chemistry* **267**(27): 19622-30.
- Gonzalez-Cadavid NF & Bhasin S. (2004) Role of myostatin in metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **7**(4): 451-7.
- Goodrich R, Johnson G & Krawetz SA. (2007) The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* **53**(3): 161-7.
- Gracies JM. (2001) Pathophysiology of impairment in patients with spasticity and use of stretch as a treatment of spastic hypertonia. *Phys Med Rehabil Clin N Am* **12**(4): 747-68, vi.
- Gracies JM. (2004) Physiological effects of botulinum toxin in spasticity. *Mov Disord* **19 Suppl 8**: S120-8.

- Gracies JM. (2005a) Pathophysiology of spastic paresis. I: Paresis and soft tissue changes. *Muscle & nerve* **31**(5): 535-51.
- Gracies JM. (2005b) Pathophysiology of spastic paresis. II: Emergence of muscle overactivity. *Muscle & nerve* **31**(5): 552-71.
- Grillner S. (2006) Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* **52**(5): 751-66.
- Hager M, Bigotti MG, Meszaros R, Carmignac V, Holmberg J, Allamand V, Akerlund M, Kalamajski S, Brancaccio A, Mayer U & Durbeek M. (2008) Cib2 binds integrin  $\alpha 7 \beta 1$  and is reduced in laminin  $\alpha 2$  chain-deficient muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry* **283**(36): 24760-9.
- Hagglund G, Andersson S, Duppe H, Lauge-Pedersen H, Nordmark E & Westbom L. (2005a) Prevention of dislocation of the hip in children with cerebral palsy. The first ten years of a population-based prevention programme. *J Bone Joint Surg Br* **87**(1): 95-101.
- Hagglund G, Andersson S, Duppe H, Lauge-Pedersen H, Nordmark E & Westbom L. (2005b) Prevention of severe contractures might replace multilevel surgery in cerebral palsy: results of a population-based health care programme and new techniques to reduce spasticity. *Journal of pediatric orthopaedics* **14**(4): 269-73.
- Han XY, Wang W, Komulainen J, Koskinen SO, Kovanen V, Vihko V, Trackman PC & Takala TE. (1999a) Increased mRNAs for procollagens and key regulating enzymes in rat skeletal muscle following downhill running. *Pflugers Arch* **437**(6): 857-64.
- Han XY, Wang W, Myllyla R, Virtanen P, Karpakka J & Takala TE. (1999b) mRNA levels for  $\alpha$ -subunit of prolyl 4-hydroxylase and fibrillar collagens in immobilized rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* **87**(1): 90-6.
- Hannon K, Kudla AJ, McAvoy MJ, Clase KL & Olwin BB. (1996) Differentially expressed fibroblast growth factors regulate skeletal muscle development through autocrine and paracrine mechanisms. *The Journal of cell biology* **132**(6): 1151-9.
- Haslam RH, Walcher JR, Lietman PS, Kallman CH & Mellits ED. (1974) Dantrolene sodium in children with spasticity. *Arch Phys Med Rehabil* **55**(8): 384-8.
- Heinen F, Döderlein D, Hustedt U, Fietzek U, Berweck S, Schröder S, Mall V, Wiedenhöfer B, Sprinz A, Benecke R, Behrens K-E, Wissel J & Krägeloh-Mann I. (2007) Botulinumtoxin für Kinder mit Zerebralparese: 10-Punkte-Tabelle, 2007. *Monatsschr Kinderheilk* **6**(155): 537-43.
- Heinen F, Molenaers G, Fairhurst C, Carr LJ, Desloovere K, Chaleat Valayer E, Morel E, Papavassiliou AS, Tedroff K, Ignacio Pascual-Pascual S, Bernert G, Berweck S, Di Rosa G, Kolanowski E & Krägeloh-Mann I. (2006a) European consensus table 2006 on botulinum toxin for children with cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol* **10**(5-6): 215-25.
- Heinen F, Schröder AS, Döderlein L, Voss W, Hustedt U, Mall V, Borggräfe I, Wiedenhöfer B, Manolikas G, Huss K, Sprinz A, Wisel J, Behrens KE, Benecke R, Fietzek UM, Breuer U, Warken B, Böhle B, Krägeloh-Mann I & Berweck S. (2009) Grafikgestützter Konsensus für die Behandlung von Bewegungsstörungen bei Kindern mit bilateral spastischer Cerebralparese (BS-CP). *Monatss Kinderheilk* (157): 789-94.
- Heinen F, Schroeder AS, Fietzek U & Berweck S. (2006b) When it comes to botulinum toxin, children and adults are not the same: multimuscle option for children with cerebral palsy. *Mov Disord* **21**(11): 2029-30.
- Himmelman K, Hagberg G, Beckung E, Hagberg B & Uvebrant P. (2005) The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. IX. Prevalence and origin in the birth-year period 1995-1998. *Acta Paediatr* **94**(3): 287-94.
- Himpens E, Van den Broeck C, Oostra A, Calders P & Vanhaesebrouck P. (2008) Prevalence, type, distribution, and severity of cerebral palsy in relation to gestational age: a meta-analytic review. *Developmental medicine and child neurology* **50**(5): 334-40.
- Hindle AK, Brody F, Tevar R, Kluk B, Hill S, McCaffrey T & Fu S. (2009) TCF7L2 expression in diabetic patients undergoing bariatric surgery. *Surg Endosc* **23**(4): 700-4.
- Hoving MA, van Raak EP, Spincemaille GH, Palmans LJ, Becher JG & Vles JS. (2009) Efficacy of intrathecal baclofen therapy in children with intractable spastic cerebral palsy: a randomised controlled trial. *Eur J Paediatr Neurol* **13**(3): 240-6.

- Hoving MA, van Raak EP, Spincemaille GH, Palmans LJ, Sleyden FA & Vles JS. (2007) Intrathecal baclofen in children with spastic cerebral palsy: a double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-finding study. *Developmental medicine and child neurology* **49**(9): 654-9.
- Hu PP, Datto MB & Wang XF. (1998) Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocrine reviews* **19**(3): 349-63.
- Hulmes DJ. (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology* **137**(1-2): 2-10.
- Ihn H, Ohnishi K, Tamaki T, LeRoy EC & Trojanowska M. (1996) Transcriptional regulation of the human alpha2(I) collagen gene. Combined action of upstream stimulatory and inhibitory cis-acting elements. *The Journal of biological chemistry* **271**(43): 26717-23.
- Ito J, Araki A, Tanaka H, Tasaki T, Cho K & Yamazaki R. (1996) Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. *Brain & development* **18**(4): 299-303.
- Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL & Jarvinen M. (2002) Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *Journal of muscle research and cell motility* **23**(3): 245-54.
- Kjaer M. (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological reviews* **84**(2): 649-98.
- Klein LE, Sigel AV, Douglas JA & Eghbali-Webb M. (1996) Upregulation of Collagen Type I Gene Expression in the Ventricular Myocardium of Throidectomized Male and Female rats. *J Mol Cell Cardiol* **28**(1): 33-42.
- Knight PJ, Fortune NS & Geeves MA. (1993) Effects of pressure on equatorial x-ray fiber diffraction from skeletal muscle fibers. *Biophysical journal* **65**(2): 814-22.
- Kruse M, Michelsen SI, Flachs EM, Bronnum-Hansen H, Madsen M & Uldall P. (2009) Lifetime costs of cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **51**(8): 622-8.
- Kunz R, Autti-Ramo I, Anttila H, Malmivaara A & Makela M. (2006) A systematic review finds that methodological quality is better than its reputation but can be improved in physiotherapy trials in childhood cerebral palsy. *J Clin Epidemiol* **59**(12): 1239-48.
- Langberg H, Skovgaard D, Petersen LJ, Bulow J & Kjaer M. (1999) Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. *The Journal of physiology* **521 Pt 1**: 299-306.
- Latash ML & Anson JG. (1996) What are "normal movements" in atypical populations? *Behavioural and Brain Sciences* **19**: 55-68.
- Lawson MA & Purslow PP. (2001) Development of components of the extracellular matrix, basal lamina and sarcomere in chick quadriceps and pectoralis muscles. *British poultry science* **42**(3): 315-20.
- Leask A, Holmes A & Abraham DJ. (2002) Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Current rheumatology reports* **4**(2): 136-42.
- Lee H, Shin H, Wimmer E & Paul AV. (2004) cis-acting RNA signals in the NS5B C-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *Journal of virology* **78**(20): 10865-77.
- Lieber RL, Steinman S, Barash IA & Chambers H. (2004) Structural and functional changes in spastic skeletal muscle. *Muscle & nerve* **29**(5): 615-27.
- Love SC, Valentine JP, Blair EM, Price CJ, Cole JH & Chauvel PJ. (2001) The effect of botulinum toxin type A on the functional ability of the child with spastic hemiplegia a randomized controlled trial. *Eur J Neurol* **8 Suppl 5**: 50-8.
- Lynn AK, Turner M & Chambers HG. (2009) Surgical management of spasticity in persons with cerebral palsy. *Pm R* **1**(9): 834-8.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J & Salehian B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *American journal of physiology* **285**(2): E363-71.
- Maas H, Baan GC & Huijing PA. (2001) Intermuscular interaction via myofascial force transmission: effects of tibialis anterior and extensor hallucis longus length on force transmission from rat extensor digitorum longus muscle. *Journal of biomechanics* **34**(7): 927-40.

- Marbini A, Ferrari A, Cioni G, Bellanova MF, Fusco C & Gemignani F. (2002) Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. *Brain & development* **24**(2): 63-6.
- Marten NW, Burke EJ, Hayden JM & Straus DS. (1994) Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *Faseb J* **8**(8): 538-44.
- Mathew A, Mathew MC, Thomas M & Antonisamy B. (2005) The efficacy of diazepam in enhancing motor function in children with spastic cerebral palsy. *J Trop Pediatr* **51**(2): 109-13.
- Mayer NH. (1997) Clinicophysiology concepts of spasticity and motor dysfunction in adults with an upper motoneuron lesion. *Muscle Nerve Suppl* **6**: S1-13.
- McCoy AM, Litterst C, Collins ML & Ugozzoli LA. Using an automated cell counter to simplify gene expression studies: siRNA knockdown of IL-4 dependent gene expression in Namalwa cells. *J Vis Exp* (38).
- McDowell BC, Kerr C & Parkes J. (2007) Interobserver agreement of the Gross Motor Function Classification System in an ambulant population of children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **49**(7): 528-33.
- Meyer-Heim A, Ammann-Reiffer C, Schmartz A, Schafer J, Sennhauser FH, Heinen F, Knecht B, Dabrowski E & Borggraefe I. (2009) Improvement of walking abilities after robotic-assisted locomotion training in children with cerebral palsy. *Arch Dis Child* **94**(8): 615-20.
- Milla PJ & Jackson AD. (1977) A controlled trial of baclofen in children with cerebral palsy. *J Int Med Res* **5**(6): 398-404.
- Molenaers G, Desloovere K, Fabry G & De Cock P. (2006) The effects of quantitative gait assessment and botulinum toxin a on musculoskeletal surgery in children with cerebral palsy. *The Journal of bone and joint surgery* **88**(1): 161-70.
- Molenaers G, Schorkhuber V, Fagard K, Van Campenhout A, De Cat J, Pauwels P, Ortibus E, De Cock P & Desloovere K. (2009) Long-term use of botulinum toxin type A in children with cerebral palsy: treatment consistency. *Eur J Paediatr Neurol* **13**(5): 421-9.
- Murphy NA, Hoff C, Jorgensen T, Norlin C & Young PC. (2006) Costs and complications of hospitalizations for children with cerebral palsy. *Pediatr Rehabil* **9**(1): 47-52.
- Myllyharju J & Kivirikko KI. (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Annals of medicine* **33**(1): 7-21.
- Nagase H & Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* **274**(31): 21491-4.
- Naumann M & Jankovic J. (2004) Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis. *Current medical research and opinion* **20**(7): 981-90.
- Nordmark E, Josenby AL, Lagergren J, Andersson G, Stromblad LG & Westbom L. (2008) Long-term outcomes five years after selective dorsal rhizotomy. *BMC Pediatr* **8**: 54.
- Novacheck TF & Gage JR. (2007) Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. *Childs Nerv Syst* **23**(9): 1015-31.
- O'Flaherty S & Waugh MC. (2003) Pharmacologic management of the spastic and dystonic upper limb in children with cerebral palsy. *Hand clinics* **19**(4): 585-9.
- Oberhofer K, Stott NS, Mithraratne K & Anderson IA. (2010) Subject-specific modelling of lower limb muscles in children with cerebral palsy. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* **25**(1): 88-94.
- Ohata K, Tsuboyama T, Haruta T, Ichihashi N, Kato T & Nakamura T. (2008) Relation between muscle thickness, spasticity, and activity limitations in children and adolescents with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **50**(2): 152-6.
- Okuyama K, Okuyama K, Arnott S, Takayanagi M & Kakudo M. (1981) Crystal and molecular structure of a collagen-like polypeptide (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>. *Journal of molecular biology* **152**(2): 427-43.
- Palisano R, Rosenbaum P, Walter S, Russell D, Wood E & Galuppi B. (1997) Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **39**(4): 214-23.
- Papavasiliou AS. (2009) Management of motor problems in cerebral palsy: a critical update for the clinician. *Eur J Paediatr Neurol* **13**(5): 387-96.
- Parkes J, Donnelly M, Dolk H & Hill N. (2002) Use of physiotherapy and alternatives by children with cerebral palsy: a population study. *Child Care Health Dev* **28**(6): 469-77.

- Parsons M, Kessler E, Laurent GJ, Brown RA & Bishop JE. (1999) Mechanical load enhances procollagen processing in dermal fibroblasts by regulating levels of procollagen C-proteinase. *Experimental cell research* **252**(2): 319-31.
- Penttinen RP, Kobayashi S & Bornstein P. (1988) Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(4): 1105-8.
- Pette D, Smith ME, Staudte HW & Vrbova G. (1973) Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscles. *Pflugers Arch* **338**(3): 257-72.
- Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**(9): e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**(9): e36.
- Platt MJ, Cans C, Johnson A, Surman G, Topp M, Torrioli MG & Krageloh-Mann I. (2007) Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. *Lancet* **369**(9555): 43-50.
- Raghow R. (1994) The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *Faseb J* **8**(11): 823-31.
- Rickham PP. (1964) Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *British medical journal* **2**(5402): 177.
- Roberts AB. (1999) TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **1**(15): 1265-73.
- Romanini L, Villani C, Meloni C & Calvisi V. (1989) Histological and morphological aspects of muscle in infantile cerebral palsy. *Ital J Orthop Traumatol* **15**(1): 87-93.
- Rose J, Haskell WL, Gamble JG, Hamilton RL, Brown DA & Rinsky L. (1994) Muscle pathology and clinical measures of disability in children with cerebral palsy. *J Orthop Res* **12**(6): 758-68.
- Rosser J, Terraz C & Dupont S. (2000) Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol Dial Transplant* **15 Suppl 6**: 66-8.
- Roy RR, Bello MA, Bouissou P & Edgerton VR. (1987) Size and metabolic properties of fibers in rat fast-twitch muscles after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* **62**(6): 2348-57.
- Rozen S & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J)* **132**: 365-86.
- Ryll U, Bastiaenen C, De Bie R & Staal B. (2011) Effects of leg muscle botulinum toxin A injections on walking in children with spasticity-related cerebral palsy: a systematic review. *Developmental medicine and child neurology* **53**(3): 210-6.
- Salmons S & Sreter FA. (1976) Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature* **263**(5572): 30-4.
- Salmons S & Vrbova G. (1969) The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *The Journal of physiology* **201**(3): 535-49.
- Schomburg ED. (1990) Spinal functions in sensorimotor control of movements. *Neurosurgical review* **13**(3): 179-85.
- Schroeder AS, Berweck S, Lee SH & Heinen F. (2006) Botulinum toxin treatment of children with cerebral palsy - a short review of different injection techniques. *Neurotoxicity research* **9**(2-3): 189-96.
- Schroeder AS, Ertl-Wagner B, Britsch S, Schroeder JM, Nikolin S, Weis J, Muller-Felber W, Koerte I, Stehr M, Berweck S, Borggraefe I & Heinen F. (2009) Muscle biopsy substantiates long-term MRI alterations one year after a single dose of botulinum toxin injected into the lateral gastrocnemius muscle of healthy volunteers. *Mov Disord* **24**(10): 1494-503.
- SCPE. (2000) Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). *Developmental medicine and child neurology* **42**(12): 816-24.
- SCPE. (2002) Prevalence and characteristics of children with cerebral palsy in Europe. *Developmental medicine and child neurology* **44**(9): 633-40.

- Sellier E, Surman G, Himmelmann K, Andersen G, Colver A, Krageloh-Mann I, De-la-Cruz J & Cans C. (2010) Trends in prevalence of cerebral palsy in children born with a birthweight of 2,500 g or over in Europe from 1980 to 1998. *European journal of epidemiology*.
- Sheehan SM & Allen RE. (1999) Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol* **181**(3): 499-506.
- Simkevich CP, Thompson JP, Poppleton H & Raghow R. (1992) The transcriptional tissue specificity of the human pro alpha 1 (I) collagen gene is determined by a negative cis-regulatory element in the promoter. *The Biochemical journal* **286** ( Pt 1): 179-85.
- Sinkjaer T & Magnussen I. (1994) Passive, intrinsic and reflex-mediated stiffness in the ankle extensors of hemiparetic patients. *Brain* **117** ( Pt 2): 355-63.
- Sjostrom M, Fugl-Meyer AR, Nordin G & Wahlby L. (1980) Post-stroke hemiplegia; crural muscle strength and structure. *Scandinavian journal of rehabilitation medicine* **7**: 53-67.
- Smyth MD & Peacock WJ. (2000) The surgical treatment of spasticity. *Muscle & nerve* **23**(2): 153-63.
- Strauss D, Brooks J, Rosenbloom L & Shavelle R. (2008) Life expectancy in cerebral palsy: an update. *Developmental medicine and child neurology* **50**(7): 487-93.
- Strauss D, Shavelle R, Reynolds R, Rosenbloom L & Day S. (2007) Survival in cerebral palsy in the last 20 years: signs of improvement? *Developmental medicine and child neurology* **49**(2): 86-92.
- Tedroff K, Granath F, Forssberg H & Haglund-Akerlind Y. (2009) Long-term effects of botulinum toxin A in children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **51**(2): 120-7.
- Tedroff K, Lowing K, Haglund-Akerlind Y, Gutierrez-Farewik E & Forssberg H. (2010) Botulinum toxin A treatment in toddlers with cerebral palsy. *Acta Paediatr* **99**(8): 1156-62.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A & Heinen E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* **75**(2-3): 291-5.
- Tilton A. (2009) Management of spasticity in children with cerebral palsy. *Semin Pediatr Neurol* **16**(2): 82-9.
- Traub W, Yonath A & Segal DM. (1969) On the molecular structure of collagen. *Nature* **221**(5184): 914-7.
- Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B & Krieg T. (1998) Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **76**(3-4): 266-74.
- Trotter JA. (1993) Functional morphology of force transmission in skeletal muscle. A brief review. *Acta anatomica* **146**(4): 205-22.
- Varga J & Jimenez SA. (1995) Modulation of collagen gene expression: its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. *Annals of internal medicine* **122**(1): 60-2.
- Venkateswaran S & Shevell MI. (2008) Comorbidities and clinical determinants of outcome in children with spastic quadriplegic cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology* **50**(3): 216-22.
- Verrecchia F & Mauviel A. (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *The Journal of investigative dermatology* **118**(2): 211-5.
- Verrecchia F & Mauviel A. (2004) TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal* **16**(8): 873-80.
- Verschuren O, Ketelaar M, Gorter JW, Helders PJ, Uiterwaal CS & Takken T. (2007) Exercise training program in children and adolescents with cerebral palsy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med* **161**(11): 1075-81.
- Westhoff B, Seller K, Wild A, Jaeger M & Krauspe R. (2003) Ultrasound-guided botulinum toxin injection technique for the iliopsoas muscle. *Developmental medicine and child neurology* **45**(12): 829-32.
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Helmberg W, Kenton DL, Khovayko O, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Pontius JU, Pruitt KD, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Starchenko G, Suzek TO, Tatusov R, Tatusova TA, Wagner L & Yaschenko E. (2005) Database resources

- of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* **33**(Database issue): D39-45.
- Xu M & Miller MS. (2004) Determination of murine fetal Cyp1a1 and 1b1 expression by real-time fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction. *Toxicol Appl Pharmacol* **201**(3): 295-302.
- Zhang Y & Derynck R. (1999) Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends in cell biology* **9**(7): 274-9.



## Eidesstattliche Versicherung

**Böhmer, Jens**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Veränderte Genexpression in der Muskulatur von Kindern mit Cerebralparese (CP)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, den 01.08.2014**

**(Unterschrift Doktorand)**